

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA UNAM

**SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DE AISLADOS CLÍNICOS DE
Sporothrix schenckii EN FASE MICELIAL Y LEVADURIFORME.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LUCIANO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Dir. de Tesis:

QFB Javier Araiza Santibañez

M. en C. Patricia Manzano Gayosso

MÉXICO DF

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	M en C Eduardo del Rey Pineda
VOCAL	QFB Javier Araiza Santibáñez
SECRETARIO	QFB Gerardo García Camacho
PRIMER SUPLENTE	M en C Juan Antonio Giménez Scherer
SEGUNDO SUPLENTE	M en C Guillermo del Rey Pineda

Sitio donde se desarrollo el tema:

**Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina
de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

Asesor interno

QFB. Javier Araiza Santibáñez

Asesor externo

M en C. Patricia Manzano Gayosso

Sustentante

Luciano Hernández Hernández

Este trabajo fue financiado por el apoyo al proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM, IN215302-2, cuyo responsable es el Dr. Rubén López Martínez y corresponsable Dra. Patricia Manzano Gayosso.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Micología Médica del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, jefe Dr. Rubén López Martínez.

Instituciones que colaboraron:

Unitat de Reserça en Malalties Infeccioses i Micologia (URMIM), IMIM, Barcelona. Jefe Dr. Josep M. Torres Rodríguez.

Unidad de Investigación Médica en Dermatología y Micología del Centro Médico Nacional (CMN) Siglo XXI, IMSS. Jefe Dr. Luis Javier Méndez Tovar.

Agradecimientos por la donación de cepas de *Sporothrix schenckii*:

Dra. Maria del Carmen Padilla Desgarenes del Centro Dermatológico Pascua (CDP).

Dr. Roberto Arenas del Laboratorio de Micología Médica Hospital General Dr. Manuel Gea González.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por que en su gracia me ha permitido existir y en mi silencio lo encuentro y se que está conmigo, pues él es el gran silencio del infinito.

A mis padres

Luciano y María Luisa por haberme enseñado el respeto y la perseverancia, en especial a mi madre por que cuando caí ella me enseñó a tener la fortaleza para levantarme y aprender.

A mi esposa y mi hija María Isabel

Porque ellas han sido la inspiración de lo que hasta hoy he logrado. Gracias por comprenderme y cuidarme.

A mis hermanos Roberto, Ricardo, Juan Carlos y Ana Luisa

Por que sin su apoyo y confianza todo hubiera sido más difícil.

A mi maestra Patricia

Por haber compartido sus conocimientos conmigo, brindarme confianza, comprensión y lo más valioso que puede tener un ser humano la amistad sincera.

Al Dr. Rubén López Martínez

Por la oportunidad y confianza que deposito en mí para realizar este trabajo.

A mi maestro Javier

Por sus sabios consejos que han servido de guía en la culminación de mi carrera. Gracias por ser un gran amigo.

Al Dr. Luis Javier Méndez Tovar

Por ser un ejemplo a seguir como persona y profesionalista, espero ser un digno alumno.

A la bióloga Blanca Millán Chiu

Por todo su apoyo y paciencia que me brindó para culminar con el presente trabajo

A mis profesores y compañeros de la facultad de Medicina

Por su apoyo y calidez que me mostraron durante mi estancia en su laboratorio donde día a día realizan una gran labor.

A mis compañeros y profesores de la UVM

En especial a Mariana, Alberto, Laura y Alejandro por que de ellos aprendí mucho, sobretodo el valor de la amistad.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	6
RESUMEN	8
CAPÍTULO I PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIFUNGICA	
I.1 INTRODUCCIÓN	10
I.2 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO	13
I.3 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA	17
I.3.1 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN LEVADURAS	17
I.3.2 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN HONGOS FILAMENTOSOS .	18
I.3.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LEVADURAS	19
I.3.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN HONGOS FILAMENTOSOS ...	20
CAPÍTULO II	
II.1 ESPOROTRICOSIS Y <i>Sporothrix schenckii</i>	22
II.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	24
II.3 ESPOROTRICOSIS EN MÉXICO	25
II.4 AGENTE ETIOLÓGICO	27
II.5 DIAGNÓSTICO	29
II.6 TRATAMIENTO	31
CAPÍTULO III	
III.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
III.2 HIPÓTESIS	36
III.3 OBJETIVOS	37
CAPÍTULO IV MATERIAL Y MÉTODOS	
IV.1 CEPAS	38

IV.2 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO	40
IV.2.1 ANTIFÚNGICOS	40
IV.2.2 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CON LAS DROGAS ANTIFÚNGICAS	40
IV.2.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO	41
IV.2.4 INOCULACIÓN DE LAS PLACAS	42
IV.2.5 LECTURA DE CMI, CMF y CME	43
IV.3 CEPAS DE CONTROL DE CALIDAD	45
IV.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
CAPÍTULO V	
V.1 RESULTADOS	47
CAPÍTULO VI	
VI.1 DISCUSIÓN	56
VI.2 CONCLUSIÓN	60
BIBLIOGRAFÍA	61
APÉNDICE	
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	70
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	72

RESUMEN

En la actualidad las pruebas de sensibilidad antifúngica *in vitro*, se han convertido en una herramienta de gran utilidad para determinar la actividad de diversas drogas antifúngicas en una gran variedad de hongos levaduriformes y filamentosos. Esta necesidad se ha dado debido al aumento en la incidencia de infecciones micóticas, como consecuencia del incremento en los factores de inmunosupresión y por el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para controlar la enfermedad que causa inmunocompromiso en el hospedero. Otro de los fenómenos observados en los hongos es el surgimiento de cepas resistentes a las drogas antifúngicas, que en los últimos años ha tomado relevancia en diferentes países.

Una de las micosis subcutáneas de gran importancia en México es la esporotricosis, cuyo agente etiológico es el hongo dimórfico *Sporothrix schenckii*. Debido a la introducción de nuevas drogas antifúngicas en el tratamiento de esta micosis, surgió el interés por realizar estudios sobre el patrón de sensibilidad antifúngica *in vitro* de este hongo frente a algunas de las drogas usadas en el tratamiento de la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad antifúngica *in vitro* de 18 aislamientos de *S. schenckii* obtenidos de diferentes formas clínicas de esporotricosis, en su fase de crecimiento micelial y levaduriforme frente a ketoconazol (KTZ), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ), fluconazol (FLZ) y terbinafina (TRB), y frente a anfotericina B (AMB) en fase levaduriforme, utilizando el método de microdilución en caldo, establecido por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) en sus documentos M27-A2 y M38-A para levaduras y hongos filamentosos respectivamente, determinando la

concentración mínima inhibitoria (CMI), fungicida (CMF) y efectiva (CME) de estas drogas frente al hongo.

El caldo de RPMI 1640 fue usado para la transformación de la fase micelial a la levaduriforme, obteniendo aproximadamente un 90% de conversión de fase en todos los aislamientos estudiados.

Terbinafina fue la droga que mostró mayor actividad antifúngica frente a ambas fases de crecimiento de *S. schenckii*, con intervalos de CMI para la fase levaduriforme de 0.03 a 0.125 µg/ml y para la micelial de 0.03 a 0.25 µg/ml. De los azoles ketoconazol fue el antifúngico con la mayor actividad con intervalos de CMI de 0.06 a 8.0 µg/ml y 0.25 a 4.0 µg/ml en su fase levaduriforme y micelial respectivamente, mientras que la actividad de voriconazol fue menor a la de itraconazol, cuyos intervalos de CMI para la fase levaduriforme fueron de 0.03 a 8.0 µg/ml y de 0.125 a 16.0 µg/ml y para la fase micelial de 1.0 a 16.0 µg/ml y de 0.5 a 16 µg/ml, respectivamente. Fluconazol fue el triazol que exhibió la más baja actividad antifúngica en ambas fases de crecimiento del hongo. Por otra parte, anfotericina B mostró valores bajos de CMI de 0.06 a 4.0 µg/ml en la fase levaduriforme. Al comparar las CMI's de los diferentes antifúngicos en ambas fases de crecimiento del hongo, observamos mayor actividad en la fase levaduriforme que en la micelial.

Itraconazol fue la única droga antifúngica que mostró valores de CME en un intervalo de 2 a 16 µg/ml. Por otra parte, terbinafina fue la droga que mostró un efecto fungicida frente a ambas fases de crecimiento del hongo.

La correlación futura entre la sensibilidad antifúngica *in vitro* y la evolución clínica de la micosis posterior al tratamiento antifúngico permitirá la detección de los aislamientos resistentes.

CAPÍTULO I. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

I.1 INTRODUCCIÓN

A medida que la industria farmacéutica fue introduciendo en el mercado nuevos antifúngicos o nuevas formulaciones de los ya conocidos, se hizo necesaria la realización de pruebas de sensibilidad con el fin de comparar la actividad de los mismos y detectar las posibles resistencias [7].

Una manera de clasificar las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos es indicar si son cuantitativas o cualitativas y si se determinan en un medio líquido o sólido.

Las pruebas de referencia son las que se basan en dilución de los antifúngicos en medio líquido, que inicialmente se realizaban en tubos de ensayo con grandes volúmenes de medio líquido. En la actualidad se utilizan microplacas con pequeños volúmenes de medio y son llamados métodos de microdilución [47,48].

En los años 80's surgieron los primeros estudios de las pruebas de sensibilidad *in vitro*, posterior a la introducción de nuevas drogas antifúngicas diferentes a anfotericina B (AMB) y 5-fluorocitosina (5-FC) para el tratamiento de micosis sistémicas. En 1985, "The National Committee for Clinical Laboratory Standard" (NCCLS), actualmente llamado Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) realizó una encuesta entre diferentes laboratorios clínicos en Estados Unidos de América y concluyó que carecían de pruebas confiables y estandarizadas de sensibilidad a antifúngicos para hongos patógenos, de tal manera que planteó el uso de métodos de dilución en caldo (macro o microdilución), cuyo primer documento se publicó en 1992 denominado como M27-P. En 1995 se publicó

el método provisional M 27-7 y, en 1997, se aprobó definitivamente el método conocido como M27-A. El complemento de este último fue el documento M38-P descrito en 1998 para el estudio de sensibilidad antifúngica en hongos filamentosos.

Las ventajas del método de microdilución, establecido por el CLSI, son: menor cantidad de medio de cultivo, mayor facilidad con economía de espacio y menor costo. El fundamento consiste en cuantificar la inhibición del crecimiento del hongo producido por el antifúngico comparado con el crecimiento producido sin antifúngico, usando el mismo medio de cultivo, pH, inóculo, tiempo y temperatura de incubación, ajustándose estrictamente a los documentos M27-A2 y M38-A, para levaduras y hongos filamentosos, respectivamente [47,48,69,14].

A pesar de que han pasado más de 20 años, aún las pruebas de sensibilidad a antifúngicos no están tan desarrolladas como las utilizadas para bacterias [56] en 1997 el CLSI presentó los criterios de sensibilidad (S), Sensibilidad dosis dependiente (SD-D) y resistencia (R) de las levaduras frente a algunos antifúngicos, así como la correlación entre la respuesta clínica y las pruebas *in vitro*. La diferencia entre cepas fúngicas sensibles y resistentes esta dada por un valor umbral de sensibilidad a un fármaco dado denominado punto de corte de la CMI, el CLSI estableció los puntos de corte de algunos antifúngicos en *Candida* spp. La mayoría de los datos se basaron en la evolución clínica de candidosis orofaríngea en pacientes con Síndrome de inmunodeficiencia adquirida y de algunos pacientes que cursaron con candidosis en otras localizaciones [58].

Existen métodos comercializados alternativos a los de referencia del CLSI, algunos se han introducido en la rutina de numerosos laboratorios de micología, y se dispone de amplia experiencia, los resultados de ciertos métodos se han correlacionado con los resultados que proporcionan los métodos de referencia del CLSI. Entre ellos cabe destacar un método colorimétrico, basado en el M27-A que agrega un indicador de pH y un colorante de manera que cuando crece el hongo el pozo cambia de color, lo que facilita la lectura del punto de corte, corresponde al método “Sensitrite” YeastOne (figura 1) [35].

Otro método que utiliza un medio sólido, con agar RPMI 1640 y ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) como amortiguador, se basa en la difusión del antifúngico en el agar, es un método cuantitativo denominado “E-test” (figura 2), el cual emplea tiras de plástico inertes con un gradiente de concentraciones de antifúngico. Posterior al inóculo del hongo en las placas de cultivo se depositan las tiras sobre el agar y a las 24-48 h de incubación a 35 °C se lee la CMI, que es el punto de intersección que ocasiona el halo-elipse de inhibición del crecimiento [57, 39].



Figura 1. Método comercializado “sensitrite”



Figura 2. Método comercializado “E-test”

I.2 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Es uno de los métodos descritos para determinación de sensibilidad antifúngica *in vitro*.

Con este método se han determinado los puntos de corte (para *Candida spp*) y los criterios de sensibilidad y resistencia. Para ello se ha tenido que estandarizar rigurosamente la concentración y el volumen del inóculo, la composición del medio de cultivo, el amortiguador a utilizar, el tipo de microplacas de plástico, los volúmenes de reactivos y los métodos de dilución de los antifúngicos. Los antifúngicos pueden ser hidrosolubles como fluconazol y 5FC o solubles en disolventes orgánicos (dimetilsulfóxido, etanol, etc.) como AMB, itraconazol, voriconazol, ketoconazol, y terbinafina.

Para disponer de una referencia válida se han seleccionado algunas cepas de levaduras que se utilizan como control de calidad (*C. parapsilosis* y *C. krusei*) que pueden obtenerse en la Colección Americana de Cepas Tipo (ATCC).

El medio de cultivo recomendado por su mejor reproducibilidad es el medio semisintético de RPMI 1640 que lleva glutamina pero no bicarbonato de sodio y que se ajusta con el tampón de MOPS 0.16M a pH 7.

Preparación del inóculo

Trabajos anteriores demostraron que concentraciones de conidios viables o esporangiosporas en un intervalo de 0.4×10^4 a 5×10^4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/ml es suficiente para reproducir los datos de CMI. Para inducir la formación de conidios y esporangiosporas muchos hongos (*Aspergillus sp.*, *Petriellidium boydii*, *Rhizopus arrhizus* y *S. schenckii*) deben ser sembrados en agar papa dextrosa (APD) a 35 °C, al séptimo día de

crecimiento se cubren las colonias con 1 ml de solución salina estéril al 0.85% (SSI) y se prepara una suspensión de conidios, la cual se ajusta a una densidad óptica de 0.09 a 0.11 (80 a 82% de transmitancia). El resultado de la mezcla de conidios o esporangiosporas y fragmentos de hifas es transferido a tubos estériles, después de 3 a 5 minutos de reposo, la parte superior de la suspensión es transferida a tubos estériles, se mezcla en vortex por 15 segundos. El inóculo se calcula con el volumen suficiente para inocular cada pozo de la microplaca, con 100 µl de la suspensión correspondiente.

Los inóculos se deben sembrar en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) a 28° C por 5 días para los conidios de las cepas problemas y determinar UFC.

Interpretación de la lectura de las microplacas

La CMI es la concentración más baja de un agente antifúngico que inhibe el crecimiento de un microorganismo al compararlo con el control de crecimiento con ayuda de un espejo invertido. A cada pozo se le asigna un número como sigue: (4) no reducción de crecimiento; (3) ligera reducción de crecimiento o aproximadamente 75% del crecimiento del control; (2) reducción de crecimiento o aproximadamente el 50% de crecimiento del control; (1) ligero crecimiento o aproximadamente el 25% de crecimiento del control y (0) claro o ausencia de crecimiento.

La CMF es la menor concentración del antifúngico que no muestra crecimiento en ADS o este es inferior a tres colonias, el cual corresponde a un 99 - 99.5% de actividad fungicida.

La CME es la menor concentración del antifúngico que ocasiona un crecimiento anormal de las hifas del hongo incubado con el fármaco.

La CME se expresa en $\mu\text{g/ml}$ y se ha correlacionado con el 50% de reducción en el crecimiento.

Agentes antifúngicos

La solución madre de antifúngicos es preparada a las concentraciones de 1600 $\mu\text{g/ml}$ o 10 veces más la concentración final del inóculo.

Las drogas no hidrosolubles deberán ser disueltas en solventes como: dimetilsulfóxido (DMSO), alcohol etílico, polietilenglicol y corboximetilcelulosa.

Para asegurar la esterilidad de las soluciones madre se pasa a través de filtros de membrana. Volúmenes pequeños de la solución madre deben ser guardados en viales estériles preferentemente a -60°C o menos de temperatura, nunca a más de -20°C .

Intervalo de concentración de antifúngicos

Basados en estudios previos los intervalos de concentración utilizados son: para AMB, KTZ, ITZ y nuevos triazoles de 0.0313 a 16 $\mu\text{g/ml}$ y para fluconazol de 0.125 a 64 $\mu\text{g/ml}$.

Criterios de resistencia

Anfotericina B

Para anfotericina B la CMI es fácil de leer como la concentración de droga más baja que impide cualquier crecimiento discernible. Algunos datos usando este procedimiento indican que las CMI para anfotericina B en muchos hongos filamentosos están entre 0.5 y 2.0 $\mu\text{g/ml}$. Por su parte, los hongos

levaduriformes se consideran resistentes frente a AMB con valores de CMI ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$.

Itraconazol

Para ITZ, KTZ y los nuevos triazoles, entre ellos VRZ, se indican CMI entre 0.0313 y 16 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, datos preliminares indican que valores de CMI $\geq 8\mu\text{g/ml}$ para hongos filamentosos, podrían estar asociados con resistencia clínica a estos agentes antifúngicos, no así para la hongos levaduriformes donde los puntos de corte son: para KTZ e ITZ $\geq 1 \mu\text{g/ml}$, para VRZ $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ y para FLZ $\geq 64 \mu\text{g/ml}$.

Fluconazol

Los hongos filamentosos usualmente no son sensibles al FLZ por lo que las CMI son mayores que 64 $\mu\text{g/ml}$. La excepción son algunos aislamientos de hongos dimórficos y dermatofitos. No obstante, no se han establecido puntos de corte para hongos filamentosos [47,48,69,19].

I.3 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA.

La aparición de resistencias a los antifúngicos puede depender de factores clínicos y microbiológicos, la resistencia antifúngica puede clasificarse en:

1) Resistencia clínica (RC)

Esta va a depender del fármaco y de diferentes factores del hospedero. Se define como la falta de inhibición del crecimiento del microorganismo en el sitio de infección, por un bajo nivel de fármaco en sangre debido a la interacción con otros medicamentos o por alteraciones inmunológicas severas en el hospedero entre otros factores.

2) Resistencia *in vitro* que a su vez se subdivide en:

A) Resistencia primaria o innata (RP)

B) Resistencia secundaria o adquirida (RS)

A) La RP es la que presenta el microorganismo de forma natural, sin tener relación con la exposición antifúngica, por ejemplo *Candida krusei* frente a fluconazol.

C) La RS es la que aparece cuando un microorganismo inicialmente sensible se hace resistente. Esta última forma de resistencia aparece con frecuencia en los pacientes infectados con el VIH, con candidosis orofaríngea y en tratamiento prolongado con fluconazol [41].

I.3.1 RESISTENCIA ANTIFUNGICA EN LEVADURAS

En la literatura se han reportado con frecuencia casos resistentes de *C. albicans* hasta en el 36% de los casos de candidosis [21]. Por su parte, Ellis D [13] demostró que *C. albicans*, y *C. parapsilosis*, eran altamente sensibles a todos los agentes antifúngicos sistémicos; por el contrario *C. glabrata* mostró

ser S y/o SD-D a FLZ, mientras que *C. krusei* fue R a este antifúngico. Estos parámetros fueron establecidos al determinar la CMI por valoración del crecimiento del hongo con antifúngico comparado con el crecimiento sin antifúngico [47,48,58].

I.3.2 RESISTENCIA ANTIFÚNGICA EN HONGOS FILAMENTOSOS

A pesar de los trabajos realizados, de microdilución en caldo en hongos filamentosos, por el CLSI, no se han establecido aún puntos de corte [13,18], sin embargo, se han realizado algunos estudios sobre la actividad fungicida de nuevas drogas antifúngicas comparándolos con las drogas de referencia [15].

Algunas variables como la composición y tamaño del inóculo, temperatura y tiempo de incubación, son factores que influyen en la detección de la resistencia a antifúngicos para establecer los puntos de corte y determinar la CMI.

En la literatura internacional se han reportado algunos estudios de sensibilidad antifúngica en estos hongos como en *Aspergillus fumigatus*, en el cual se han demostrado que algunas cepas han presentado resistencia a ITZ, también se ha visto reacción cruzada con otros azoles como VRZ [45]. Otro de los hallazgos es que los aislamientos de *Scedosporium apiospermum* y *S. prolificans* han presentado resistencia intrínseca a AMB [15].

Debido a la introducción de nuevas drogas antifúngicas y a la disponibilidad de otras formas de administración algunos autores se han interesado en conocer la actividad *in vitro* de los antifúngicos frente a hongos filamentosos. La mayoría de los estudios se han realizado solo en fase micelial, Morera Y y cols [43] destacaron la elevada sensibilidad de la fase micelial de *S. schenckii* a ITZ.

Por su parte, Mc Ginnis M y cols [40] reportaron que *S. schenckii* es más sensible *in vitro* a ITZ que a VRZ en fase micelial, no obstante, Kohler L. y cols [31] informaron mayor actividad *in vitro* de la TBR con respecto a ITZ de 30 aislamientos de *S. schenckii* en fase lavaduriforme.

Johnson E. y cols [27] reportaron que VRZ podría ser efectivo contra un amplio rango de infecciones en humanos por hongos filamentosos, no obstante, esta droga tuvo menor actividad antifúngica contra *S. schenckii* en fase micelial comparado con AMB. Ellis D [13] reportó que algunos aislamientos de *S. schenckii* mostraron resistencia primaria a AMB.

Nakai T y cols [46] determinaron que la forma de crecimiento empleada en pruebas de sensibilidad antifúngica de hongos dimórficos puede influir considerablemente en la interpretación de resultados.

I.3.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN LEVADURAS

Diversos estudios han establecido que diferentes alteraciones celulares han contribuido a la resistencia de algunas levaduras como *C. albicans* y *C. krusei* entre otras. Las alteraciones han sido clasificadas hasta ahora en 4 distintos mecanismos de resistencia.

1) Falla en la acumulación de la droga.

En estudios *in vitro* con varios aislamientos clínicos post-tratamiento, de *Candida spp*, *C. neoformans* y el hongo filamentosos *A. fumigatus*, expuestos a altas concentraciones de drogas antifúngicas, se ha observado cierta incapacidad de la droga para generar concentraciones intracelulares que inhiban el crecimiento de estos hongos. Estos fenómenos se han ligado a la activación de ciertos genes de los hongos que codifican a transportadores de

multidroga (bombas de eliminación activa), algunos de estos transportadores como el ABC-transporter de *C. albicans* aceptan como sustrato a casi todos los antifúngicos azólicos, mientras que otros como el MF-transporter sólo acepta a FLZ como sustrato.

2) Alteraciones del gene ERG11p.

El gene ERG11p codifica a la diana de los derivados azólicos (14- α esteroles desmetilasa) ciertas mutaciones de este gen han modificado algunos de los aminoácidos de estas enzimas donde se unen los azoles, puede ser que los aminoácidos sustituidos afecten el enlace óptimo a los azoles.

3) Aumento de la transcripción del gen ERG11p.

Este fenómeno conlleva al aumento en el número de copias de dianas de los derivados azólicos, aunque se considera con modesto efecto en el desarrollo de resistencia a los azoles

4) Alteración en la composición de los esteroides.

La resistencia a los azoles ha sido relacionada a la alteración en la composición del esteroles, en pocos casos hasta ahora. La mutación del gen Erg 3 conlleva a la mutación de la enzima C 5,6 esteroles desaturasa implicada en la síntesis del ergosterol resultando en la ausencia de este, lo cual podría explicar la resistencia a anfotericina B [63].

I.3.4 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN HONGOS FILAMENTOSOS

En términos generales son tres los mecanismos de resistencia identificados hasta ahora para hongos filamentosos que hacen que una célula inicialmente sensible se haga resistente a los agentes antifúngicos. Así mismo se sabe que muchos de estos mecanismos pueden co-existir en una misma célula.

- 1.- Incapacidad del fármaco para alcanzar el sitio blanco dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activos del compuesto al exterior.
- 2.- Cambios en la interacción fármaco-diana (aumento en la expresión de la diana de los azoles).
- 3.- Modificaciones en las enzimas de las vías metabólicas (alteraciones en las dianas de los azoles y alteraciones en la biosíntesis del ergosterol) [41].

CAPÍTULO II.

II.1 ESPOROTRICOSIS Y *Sporothrix schenckii*

La esporotricosis es una micosis subcutánea, subaguda o crónica, causada por un hongo dimórfico llamado *Sporothrix schenckii* (Hektoen y Perkins, 1900) que penetra en el hospedero por un traumatismo en la piel causada con plantas secas o verdes, picaduras de insectos, mordedura de roedores, traumatismo con instrumentos metálicos o accidentalmente en el laboratorio. Otro mecanismo es por la inhalación de los conidios de *S. schenckii*. Clínicamente la esporotricosis puede tener manifestaciones cutáneas o extracutáneas [36,33,2], se localiza principalmente en miembro torácico y cara. Las formas cutáneas de esporotricosis se clasifican en: linfo-cutánea (ELC), cutánea-fija (ECF) y cutánea diseminada (ECD) [33]. En la primera variedad clínica se forma un nódulo que se reblandece y ulcera (chancro esporotricósico de inoculación), seguido de lesiones nodulares o gomosas, que siguen el trayecto de los vasos linfáticos (figura 3). La ECF es localizada y polimorfa, se caracteriza por la formación de placas verrugosas, eritematosas y ulceradas [70,42], (figura 4). La ECD es una forma clínica rara, afecta más de una región corporal y se presenta generalmente en pacientes con algún factor de inmunosupresión; se caracteriza por nódulos, placas o úlceras (figura 5).



Figura 3. Esporotricosis linfangítica.



Figura 4. Esporotricosis cutánea fija.



Figura 5. Esporotricosis cutánea diseminada.

Las formas extracutáneas o sistémicas afectan pulmones, huesos, articulaciones o se diseminan a otros órganos, el mecanismo de infección es por inhalación de los propágulos de *S. schenckii* en pacientes inmunosuprimidos [26,59].

La esporotricosis tiene amplia distribución mundial, se ha reportado en todos los continentes, el mayor número de casos se presenta en América intertropical predominando en México, Uruguay y Guatemala. Es considerada como una enfermedad ocupacional. Afecta y se puede observar en todas las edades, las formas cutáneas se presentan por igual en hombres y mujeres [6].

II.2 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El primer caso de esporotricosis fue descrito en 1898, en Baltimore, EUA por Benjamín Schenk, quien reportó la clásica esporotricosis linfangítica, el hongo aislado fue clasificado por Smith en el género *Sporotrichum* [6].

Dos años más tarde Hektoen y Perkins informaron el segundo caso y al hongo causal se le asignó el nombre binomial *Sporothrix schenckii*.

En 1903, De Beurmann y Ramond describieron la enfermedad en Francia y se utilizó por primera vez yoduro de potasio como tratamiento de elección. En 1905, se modificó el nombre binomial al hongo aislado por *Sporotrichum beurmanni* y se consideró como diferente al descrito por Schenk. En 1910, Matruchot lo reportó como *Sporotrichum schenckii* [2].

En 1907, Lutz y Splendore, en Brasil, comunicaron el primer caso en una rata y es la primera vez en describir la estructura parasitaria (cuerpo asteroide).

En 1912, De Beurmann y Gougerot publicaron la obra clásica del tema “Les sporotrichoses” donde se hace una descripción de las formas cutáneas, pulmonares, diseminadas a hueso y mucosas, así como el tratamiento con yoduro de potasio [52].

En 1963, Carmichael determinó que el nombre binomial del agente causal de esporotricosis era *Sporothrix schenckii*, por ser el primer nombre asignado a este hongo [2].

II.3 ESPOROTRICOSIS EN MÉXICO

La esporotricosis es la micosis subcutánea de mayor relevancia en nuestro país, las características del clima, como temperatura media, grado de humedad, etc., condicionan, en parte, la existencia de las zonas de endemia de esporotricosis [33]. En México, el primer caso de esporotricosis fue reportado por Gayón en 1913, Aguirre Pequeño reportó el segundo [68]. Es importante destacar los estudios realizados por González Ochoa quien en 1947, junto con Soto-Figueroa extraen y purifican el primer antígeno de naturaleza polisacáridica, utilizándolo con excelentes resultados en pruebas intradérmicas, para un fin diagnóstico y de investigación epidemiológica. Rodríguez Vindas concluyó que tiene un alto valor diagnóstico en lesiones clínicamente sugestivas en lugares donde se carece de medios físicos y humanos para el aislamiento e identificación del agente causal. [6,52].

Prácticamente se ha presentado en todos los estados de la república, son dos las zonas más importantes: el occidente (Jalisco y Nayarit), y la zona centro, incluyendo los estados de Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y el Distrito Federal [6]. Espinoza Taxis A y cols [20] reportaron un estudio de 50 pacientes con esporotricosis, donde la mayoría de los pacientes procedían del estado de Puebla (32%), Distrito Federal (28%) y del estado de Jalisco (16%). Por otro lado, Lavalle P [33] reportó el origen de 220 pacientes con esporotricosis donde más del 40% la adquirieron en el Distrito Federal de fuentes autóctonas (paja, zacates, flores, etc.), procedentes de otras zonas endémicas del país. El segundo lugar correspondió al estado de Guanajuato (12.3%), principalmente del centro (Dolores Hidalgo) y del sur (Acámbaro). La sierra norte de Puebla

ocupó el tercer lugar con el 7.7% de los casos, y el estado de Jalisco ocupó el cuarto lugar con el 5.9% de los casos.

II.4 AGENTE ETIOLÓGICO

La palabra *Sporothrix* literalmente significa agente que siembra el pelo donde sporo = siembra; thri = pelo; um = agente [9].

S. schenckii es un hongo dimórfico, en el medio ambiente es un hongo filamentoso que ha sido aislado de rosas, espinas, madera, hojas secas, insectos muertos y larvas; en los tejidos del huésped y ciertos medios a temperaturas entre 35-37 °C se comporta como una levadura polimórfica [53].

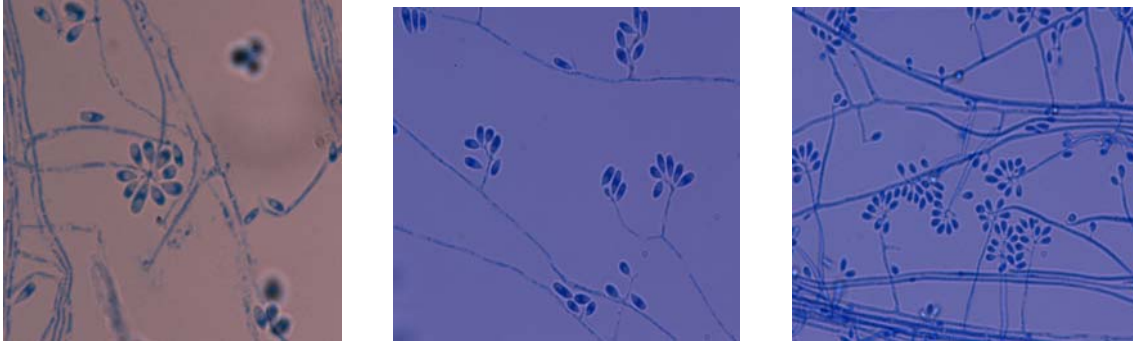
Fase micelial. *S. schenckii* crece en agar dextrosa Sabouraud con y sin cicloheximida y cloranfenicol, incubados de 25 a 30 °C durante 3 semanas, las colonias aparecen entre el quinto y sexto día, inicialmente son blanquecinas (figuras 6 y 7) y después se tornan oscuras o negruzcas a los 10 o 15 días (figura 8), en ocasiones permanecen sin pigmento, o bien presentan asociación de los dos tipos de colonias. Su superficie es plana y finamente radiada, posteriormente puede ser plegada y membranosa, [34].



Figuras 6,7 y 8. *S. schenckii*. Aspecto de las colonias

Microscópicamente, las hifas son delgadas, septadas y ramificadas de 3µm de diámetro, los conidióforos son largos y delgados de 1 a 2µm de diámetro en su base a 0.5 – 1µm en el ápice estos surgen en ángulo recto, los conidios son ovoides, piriformes o esféricos de paredes delgadas, típicamente dispuestos en el ápice en forma simpodial en cúmulos, semejando “flores de margarita”; al

lado de estos conidios se observan otros aislados de paredes gruesas y triangulares a los que se les atribuye la formación del pigmento de la colonia (figuras 9, 10 y 11) [60,33].



Figuras 9, 10 y 11. Disposición de los conidios de *S. schenckii*.

Fase levaduriforme. Esta fase se puede obtener *in vitro* cultivada en medios ricos en nutrientes tales como el agar sangre, agar infusión cerebro corazón y otro de los medios recomendados es agar sangre glucosa-cisteína a 37 °C con un pH de 7.2. El desarrollo se obtiene de 3 a 5 días, presentándose colonias cremosas, blanco amarillentas, ligeramente acuminadas, superficie radiada [71,60]. Microscópicamente, las levaduras son ovoides, globosas, unigemantes, bigemantes y algunas veces con gemación múltiple de 5µm de diámetro mayor, por 2 a 3µm de diámetro menor [12].

II.5 DIAGNÓSTICO

En la mayoría de los casos el diagnóstico clínico es sencillo y se corrobora por estudios micológicos [42], principalmente con los cultivos obtenidos del exudado de las lesiones, escamas, fragmentos de tejido, o esputo, en agar dextrosa Sabouraud con y sin antibióticos, incubados a 28°C. Las colonias aparecen en un tiempo promedio de 5 a 8 días [6].

El examen directo del material purulento, generalmente tiene poco valor diagnóstico, porque es difícil demostrar las características formas de levaduras incluso con tinciones especiales. Algunos autores mencionan el hallazgo de cuerpos asteroides y en especial cuando se utiliza aspiración con aguja fina [32,52].

La histopatología aunque no es patognomónica de la enfermedad, permite en numerosas ocasiones sospechar el diagnóstico, es un estudio de bajo costo que se puede realizar en poco tiempo con las tinciones de Hematoxilina-Eosina, Gomori-Grocott y Acido Peryódico de Schiff, resulta ser un procedimiento que con cierta experiencia ayuda en el diagnóstico de esta micosis. El examen microscópico ayuda a establecer el diagnóstico cuando se encuentran en los cortes cuerpos asteroides los cuales se observan como una esfera central con prolongaciones radiantes o células levaduriformes en el seno de los microabscesos y en un ambiente tisular de denso infiltrado inflamatorio mixto, [49,37]. Gezuele E y Da Rosa D [22] recomendaron que la obtención de material más profundo en el proceso granulomatoso crónico y la búsqueda exhaustiva con un número mayor de cortes del bloque de tejido de cada paciente parece ser la clave para mejorar los resultados y estandarizar el

hallazgo de cuerpos asteroides esporotricósicos para iniciar el tratamiento precoz sin esperar el resultado del cultivo.

La intradermorreacción se realiza con esporotricina y consiste en la aplicación intradérmica de 0.1 ml de esporotricina metabólica. La lectura se realiza a las 48 h y se considera positiva una induración de más de 5mm, [52].

De acuerdo con González-Ochoa y Kaplan W [24] los anticuerpos fluorescentes pueden usarse como un método rápido para la demostración de *S. schenckii* en improntas del exudado de las lesiones. Espinoza Taxis A. y cols [20] reportaron que la Inmunofluorecencia indirecta (IFI) fue el método más eficiente para el diagnóstico de esporotricosis, seguido del cultivo, la IDR y la histopatología.

II.6 TRATAMIENTO

El yoduro de potasio (KI) es el medicamento de primera elección, ofrece una terapia efectiva y de bajo costo, se utiliza en la ECL y ECF, la mejoría de las lesiones se nota después de la primera semana de terapia, sin embargo, se pueden presentar efectos secundarios como dolor abdominal, náuseas, diarrea y vómitos además de que por el uso prolongado pueden presentarse síntomas de yodismo (sensación de quemadura y humedad en la boca, sabor metálico, dolor de los dientes y cefalea). El exceso de yodo puede dar como resultado interrupción de la producción de hormona tiroidea; en pacientes con función tiroidea deficiente altera el mecanismo autorregulador y conduce a hipotiroidismo [44]. Aparentemente el KI no tiene una acción directa sobre *S. schenckii* y aunque no se sabe con certeza la función de esta droga en los procesos de curación se cree que interacciona con la respuesta inmune del huésped a nivel de la mieloperoxidasa estimulando el proceso de fagocitosis, no obstante, a la fecha se carece de evidencias concluyentes para determinar como es que el KI actúa y en que procesos o factores inmunes se ve implicado en la esporotricosis [65].

En México, diversos autores como Padilla MC y cols [52] comprobaron la eficacia del KI como tratamiento en un caso de ECF. Por otro lado, Aracena T y cols [1] informaron del caso de una ECF en una lactante tratada satisfactoriamente con KI. Villanueva E y cols [70] reportaron el caso de una ECL infantil que fue tratada con KI obteniendo resolución de las lesiones en aproximadamente 2 meses.

El mecanismo de acción del KI, el complicado régimen de dosificación, su uso solo en ELC y ECF y los efectos secundarios limitan su uso en esta

enfermedad, de tal manera que ha sido sustituido por otras drogas antifúngicas como ITZ, FLZ y TRB [55].

Los derivados azólicos son un grupo de fármacos fungistáticos sintéticos, inhiben las enzimas oxidativas asociadas al citocromo P 450, bloqueando la conversión de lanosterol en ergosterol produciendo una alteración en la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas. Producen la acumulación de peróxido de hidrógeno capaz de lesionar la estructura de los organelos intracelulares del hongo. La biodisponibilidad del grupo de azólicos por vía oral es elevada [8].

Itraconazol es frecuentemente utilizado en el tratamiento de la ELC y ECF con resultados satisfactorios [31]. Kauffman CA [29] y Lortholary O y cols [38] reportaron que ITZ parece ser tan efectivo como AMB en el tratamiento de algunas formas clínicas de esporotricosis extracutánea en pacientes inmunosuprimidos.

Restrepo y cols [56] informaron del uso satisfactorio de 100mg de ITZ diario en 17 pacientes en edad escolar con cultivo negativo a 80 y 90 días, sin efectos secundarios hepáticos ni hematológicos. Méndez LJ y cols [42] reportaron un caso de ECF tratada con ITZ presentando curación clínica y micológica en 4 meses. Poletti E y cols [55] reportaron 4 casos de esporotricosis infantil tratados con ITZ de los cuales dos respondieron satisfactoriamente. Ozcan A y cols [50] reportaron el tratamiento satisfactorio con 400mg/día de ITZ por 4 meses en un caso de ELC, pese a estos reportes del tratamiento exitoso de la enfermedad con ITZ, entre otros más, Sandhu K y Gupta S [61] reportaron el caso de una ECL que no respondió al tratamiento con ITZ por lo cual se recurrió al KI de manera exitosa. Unemoto M y cols [67] describieron el

segundo caso en la literatura de esporotricosis en una pareja tratados satisfactoriamente con la combinación de ITZ y KI, no obstante, Shinogi T y cols [64] presentaron el caso de un paciente con ECF resistente al tratamiento combinado de KI e ITZ por lo que se sometió a tratamiento quirúrgico con reactivación después de 5 años.

FLZ ha mostrado menos efectividad que ITZ en el tratamiento de ECL y ECF y podría ser indicado solamente en pacientes que no toleran el tratamiento con KI o ITZ, la dosis recomendada es de 400mg/día, durante 6 meses [11,30].

KTZ ha mostrado pobre eficacia contra diferentes formas clínicas de esporotricosis, sin embargo, por estudios *in vitro* ha mostrado muy buena actividad frente a *S. schenckii* [38,66].

Otras drogas antifúngicas también utilizadas con buenos resultados son las alilaminas (terbinafina) para el tratamiento de las formas cutánea de esporotricosis [54]. Estas drogas actúan interfiriendo la epoxidación del escualeno; bloquean la síntesis de lanosterol y por ende del ergosterol, con mínimos efectos colaterales. Estudios clínicos reportados han sugerido que es segura y eficaz para el tratamiento de ELC y ECF a dosis mayores de 500mg/día, aproximadamente 18 semanas; sin embargo, el régimen óptimo y la duración del tratamiento no ha sido definido con precisión [2,25]. Chapman S y cols [10] realizaron un estudio comparativo de la eficacia y seguridad con dos dosis de TRB (500 y 1000mg/día) en el tratamiento de esporotricosis cutánea, ambas dosis fueron bien toleradas y efectivas, no obstante, la menor dosis mostró recaídas postratamiento. A pesar de estos resultados, Kan V y Bennett J [28] reportaron que TRB no mostró eficacia en el tratamiento de esporotricosis sistémica en modelos murinos.

Por otro lado, algunos autores sugieren el tratamiento combinado de TRB y KI como agentes de elección para el tratamiento de las formas cutáneas de esporotricosis [5].

Anfotericina B es un macrólido heptaeno que se fija ávidamente a los esteroides de la membrana de células eucariotas con la formación de poros compuestos de pequeños agregados de AMB y esteroides. Estos defectos originan una despolarización de la membrana y un aumento de la permeabilidad para protones y cationes monovalentes. La vía de administración es intravenosa [8]. La AMB es utilizada en el tratamiento principalmente de esporotricosis extracutánea, la dosis total es de 1 a 3 g intravenosa durante 2 a 3 meses, el principal problema asociado con el uso de AMB son los efectos secundarios que incluyen fiebre, cefalea, insuficiencia renal y anemia [13].

Otra terapia que muestra alguna eficacia es la aplicación local de calor [53].

Es importante hacer hincapié en la necesidad de una orientación precoz del diagnóstico de la esporotricosis y un tratamiento adecuado para una resolución rápida y total que evitará complicaciones [51].

CAPÍTULO III.

III.1 PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La esporotricosis es la infección micótica subcutánea más frecuente en México, y aunque el KI ha sido utilizado en el tratamiento de las formas cutáneas de esporotricosis con resultados satisfactorios, los efectos adversos así como su contraindicación en algunas enfermedades de tiroides limitan su uso. Por otro lado, para el tratamiento de las formas diseminadas y extracutáneas se ha utilizado AMB con buenos resultados, no obstante, presenta un grado elevado de toxicidad. En la literatura mundial los trabajos realizados sobre sensibilidad antifúngica en *S. schenckii* son pocos, y la mayoría de éstos solo se llevan a cabo con la fase micelial; en México no existe un trabajo previo que evalúe el comportamiento *in vitro* del hongo en sus dos fases de crecimiento frente a las drogas antifúngicas; estos hechos, sumados al surgimiento de cepas de hongos filamentosos y levaduriformes resistentes a la acción de las drogas antifúngicas, generan la necesidad de realizar estudios de sensibilidad *in vitro* que evalúe la actividad fungistática y fungicida de diversas drogas contra el agente causal de la esporotricosis y que sirvan de apoyo a los médicos clínicos en el tratamiento de esta enfermedad con nuevas alternativas terapéuticas que proporcionen eficacia y seguridad.

III.2 HIPÓTESIS

- ITR y TRB son las drogas antifúngicas que presentarán mayor actividad frente a ambas fases de crecimiento del hongo, tomando en consideración algunos trabajos previos del uso satisfactorio de ITR y TRB en el tratamiento de la esporotricosis cutánea.
- KTZ y VRZ presentarán buena actividad inhibitoria sobre ambas fases de crecimiento de *S. schenckii*.
- FLZ tendrá pobre actividad antifúngica frente a ambas fases de crecimiento del hongo.
- La fase de crecimiento del hongo será un factor determinante en el patrón de sensibilidad antifúngica de las drogas usadas.
- El caldo RPMI 1640 optimizará la transformación de la fase micelial a la levaduriforme del hongo.

III.3 OBJETIVOS

- Establecer y comparar la CMI₅₀, CMI₉₀, CMF y CME de las diferentes drogas antifúngicas usadas frente a los aislados clínicos de la enfermedad.
- Diferenciar el patrón de sensibilidad entre las fases de crecimiento levaduriforme y filamentosa de los aislados de *S. schenckii*.
- Determinar si el caldo de RPMI 1640 es adecuado para la conversión de la fase micelial a la levaduriforme en los diferentes aislados de *S. schenckii*.

CAPÍTULO IV MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 CEPAS

Se estudiaron 18 aislamientos obtenidos de pacientes con diferentes formas clínicas de esporotricosis (12 casos de ECL, 5 de ECF y 1 de ECD) procedentes del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional siglo XXI; IMSS, Hospital General Dr. Manuel Gea González y Centro Dermatológico Pascua.

Fase micelial de *S. schenckii*

Los 18 aislamientos se identificaron por estudio morfológico macroscópico (figura 12) y microscópico (figura 13) y se mantuvieron en agar papa dextrosa a 4°C hasta su uso.



Figura 12. *S. schenckii* aspecto macroscópico

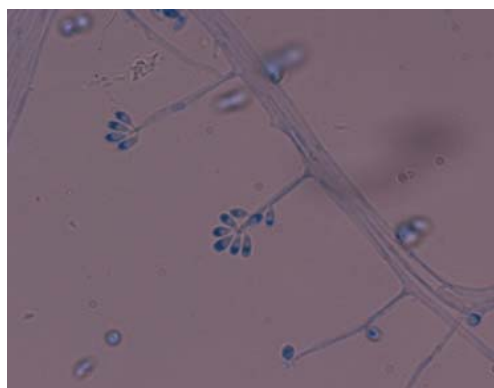


Figura 13. *S. schenckii* aspecto microscópico

Fase levaduriforme de *S. schenckii*

La transformación de *S. schenckii* a la fase levaduriforme, se llevó a cabo en caldo RPMI 1640. Los aislados se cultivaron en APD durante 5 días a 28°C, posteriormente se hizo una suspensión concentrada de conidios en SSI de la cual se inocularon 500µl en matraces que contenían el caldo RPMI 1640. Los matraces se incubaron a 35°C en agitación constante a 150 revoluciones por minuto durante 5 días (figura 14).



Figura 14. Obtención de levaduras en caldo RPMI 1640.

De cada uno de los matraces se realizó un examen microscópico directo con azul de algodón para verificar la transformación a levaduras, posteriormente se tomó un inóculo para realizar la transformación a la fase micelial en agar dextrosa Sabouraud incubados a 25°C.

IV.2 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Para el estudio de sensibilidad antifúngica por microdilución en caldo se siguieron las recomendaciones del documento M38 A para la fase micelial y del documento M 27 A2 para la fase levaduriforme del CLSI.

IV.2.1 ANTIFÚNGICOS

Para este estudio se emplearon los siguientes antifúngicos: KTZ, ITZ, VRZ, FLZ, TRB y AMB (este solo en la fase levaduriforme).

VI.2.2 PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CON LAS DROGAS ANTIFÚNGICAS

Se emplearon placas estériles de 96 pozos de fondo cóncavo (figura 15). Se partió de una solución madre, previamente preparada con 16 mg de la sal en 10ml de DMSO para los antifúngicos no hidrosolubles y en 64 ml de SSI para FLZ; para obtener una concentración final de 1600 μ g/ml para KTZ, ITZ, VRZ, TBR y AMB y de 6400 μ g/ml para FLZ. Se esterilizó por filtración con unidades filtro de 0.2 micras de diámetro. Se realizaron diluciones de acuerdo con los antifúngicos para obtener las siguientes concentraciones: para KTZ, ITZ, VRZ, TBR y AMB de 0.03 a 16 μ g/ml en DMSO como disolvente y para FLZ de 0.125 a 64 μ g/ml en RPMI. En los pozos de las columnas 1 a la 10, se depositaron 100 μ l de las diferentes concentraciones de los antifúngicos siendo los pozos de la columna número 1 los que contenían la mayor concentración de la droga y los pozos de la columna número 10 los que contenían la menor concentración. Los pozos de la columna 11 fueron el control de crecimiento y

los de la columna 12 el control de esterilidad, en ambas se depositaron 100 μ l de RPMI.

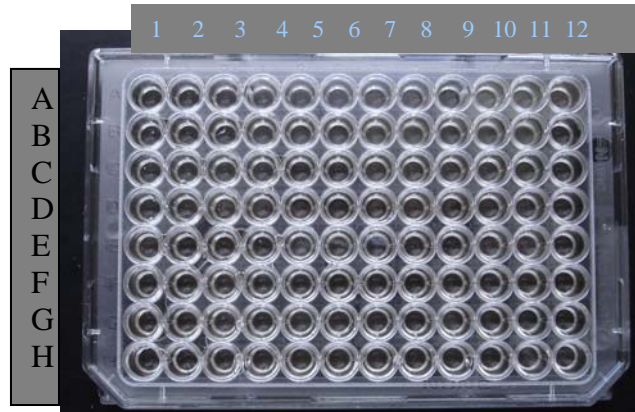


Figura 15. Placa de fondo cóncavo para microdilución

IV.2.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Fase micelial

Todos los aislados se cultivaron en APD durante 5 días a 28°C, después se preparó una suspensión de conidios en SSI a una concentración de 1×10^6 conidios/ml y finalmente se realizó una dilución 1:50 en RPMI para obtener una concentración final del inóculo de 1×10^4 UFC/ml para cada aislamiento. La concentración del inóculo fue verificada por la determinación del conteo colonial en agar dextrosa Sabouraud (figura 16).

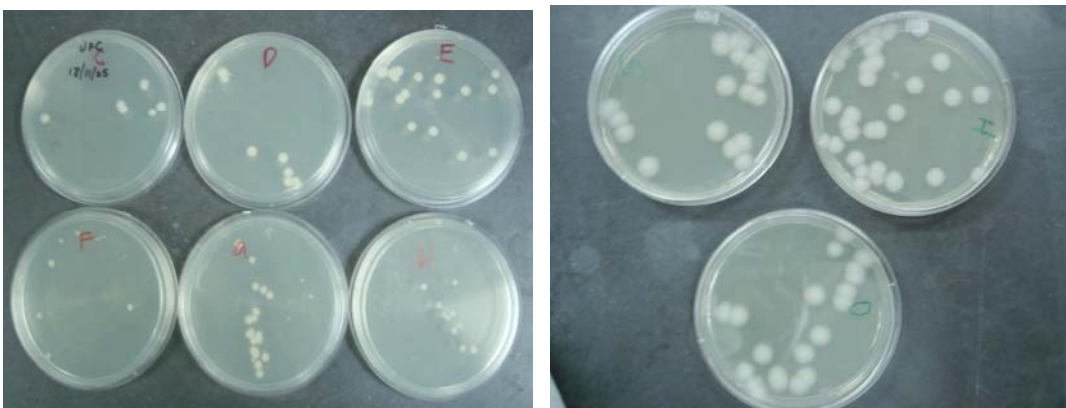


Figura 16. Colonias de *S. schenckii* en SS para conteo de UFC/ml.

Fase levaduriforme

Cada aislamiento de *S. schenckii* se resembró en APD a 28°C durante 7 días, posteriormente se obtuvo la transformación a la fase levaduriforme en caldo RPMI 1640, bajo las condiciones mencionadas con anterioridad, y se realizó una dilución en RPMI a una concentración de 1×10^6 UFC/ml para finalmente realizar una dilución 1:1000 que nos daba una concentración final del inóculo de 1×10^3 UFC/ml.

Los inóculos de control de calidad *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 se resembraron 1 día anterior a la inoculación y se prepararon a la misma concentración que los inóculos para la fase levaduriforme del hongo.

IV.2.4 INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

La inoculación de las placas, previamente preparadas con las drogas antifúngicas, para ambas fases de crecimiento del hongo se realizó de la siguiente manera:

Cada pozo de las filas "C" a la "H" fue inoculado con 100µl de la suspensión del inóculo (conidios o levaduras) (figura 17), los pozos de control de crecimiento contenían 100 µl de la suspensión de inóculo y 100µl de RPMI con el disolvente sin concentración de antifúngico, mientras que el control de esterilidad solo contenía RPMI y el disolvente.



Figura 17. Inoculación de las placas

Los controles de calidad *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 fueron probados de la misma manera, a estos les correspondió las filas “A” y “B” respectivamente (fig 18) y se incluyeron en cada prueba realizada.

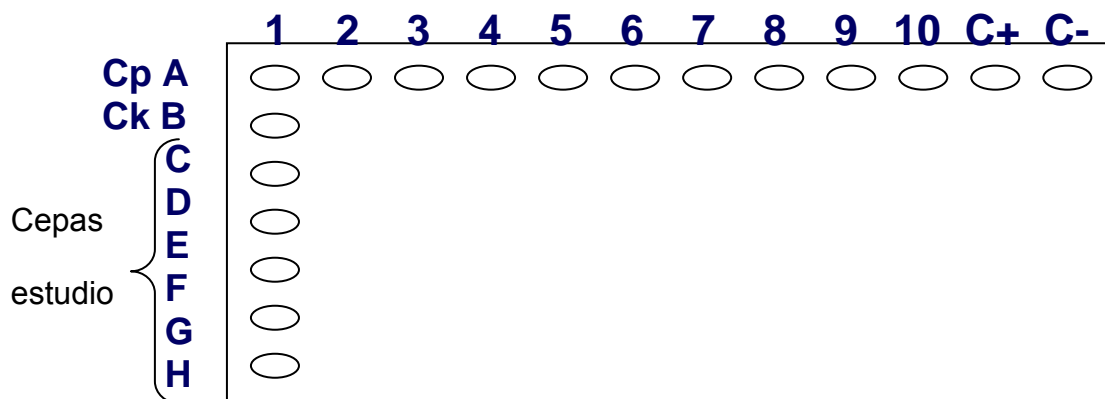


Figura 18. Distribución de inóculos en la microplaca

Todas las placas de microdilución fueron incubadas a 35°C. El crecimiento de *S. schenckii* se evaluó después de 24, 48 y 72 horas de la incubación.

IV.2.5 LECTURA DE CMI, CMF y CME

Lecturas de CMI

La lectura de las placas, para determinar la actividad fungistática, se realizó a las 24, 48 y 72 h mediante lectura visual con un espejo invertido y con

espectrofotómetro (Labsystems multiskan MS filtro 405), la CMI₅₀ se determinó como el 50% de inhibición con respecto al pozo de control de crecimiento y la CMI₉₀ como el 90% de inhibición respecto al pozo de control de crecimiento.

Los parámetros de puntos de corte para considerar resistencia en la fase levaduriforme según el documento M27 A2 del CLSI son los siguientes: para ITZ y KTZ ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ y un rango de 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$ como SDD para ITZ; para FLZ ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ y un rango de 16-32 $\mu\text{g/ml}$ como SDD; para VRZ ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ y para AMB ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ y aunque todavía no se han establecido puntos de corte para hongos filamentosos el documento M38 A del CLSI sugiere los siguientes valores: para KTZ, ITZ, VRZ y TRB un valor de CMI ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ y para FLZ $\geq 64\mu\text{g/ml}$ [46,47].

Lecturas de CMF

La actividad fungicida *in vitro* se determinó en los 18 aislamientos de *S. schenckii*, después de efectuar la última lectura de CMI.

Se tomaron 10 μl del último pozo que presentó crecimiento discernible, y de los que mostraron inhibición completa (pozo ópticamente claro) y se sembraron en cajas de Petri que contenían ADS, se incubaron de 3 a 5 días a 25 °C, el valor considerado de CMF fue la concentración del pozo que dio menos de tres colonias de crecimiento.

La CMF es igual o superior a la correspondiente CMI para el mismo aislamiento [18,47,48].

Lecturas de CME

Para la determinación de CME se tomaron 10 μl del contenido de los pozos que mostraron inhibición del crecimiento, se realizó un examen directo con azul de

algodón y se observó al microscopio óptico a 40X. Se buscó el crecimiento anormal de las hifas con ramificaciones cortas y abundantes [3,4].

IV.3. CEPAS DE CONTROL DE CALIDAD

Los aislamientos de referencia de sensibilidad conocida utilizados para control de calidad fueron *Candida parapsilosis* (cp) ATCC 22019 y *Candida krusei* (ck) ATCC 6258, mantenidos en ADS. Los inóculos se prepararon con colonias de 24 horas de crecimiento, en ADS a 35 °C, ajustando a una concentración final de 1×10^3 UFC/ML. Los rangos de CMI para estas cepas se muestran en la tabla 1[47,48].

Tabla 1. Rangos de CMI para las cepas control de calidad (CLSI).

Antifúngico	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)		<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	
	24 h µg/ml	48 h µg/ml	24 h µg/ml	48 h µg/ml
KTZ	0.03-0.125		0.125-1.0	0.25-1.0
ITZ	0.125-0.5	0.125-0.5	0.125-1.0	0.25-1.0
VRZ	0.016-0.125	0.03-0.25	0.06-0.5	0.25-1.0
FLZ	0.5-4.0	1.0-4.0	8.0-64.0	16-128.0
AMB	0.25-2.0	0.5-4.0	0.5-2.0	1.0-4.0

IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron con el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), se calcularon valores de rango, media geométrica (MG), CMI 50% y CMI 90%.

Los valores obtenidos se compararon por el método de Anova (Análisis de la varianza) y la significancia estadística se consideró $p < 0.05$.

CAPÍTULO V

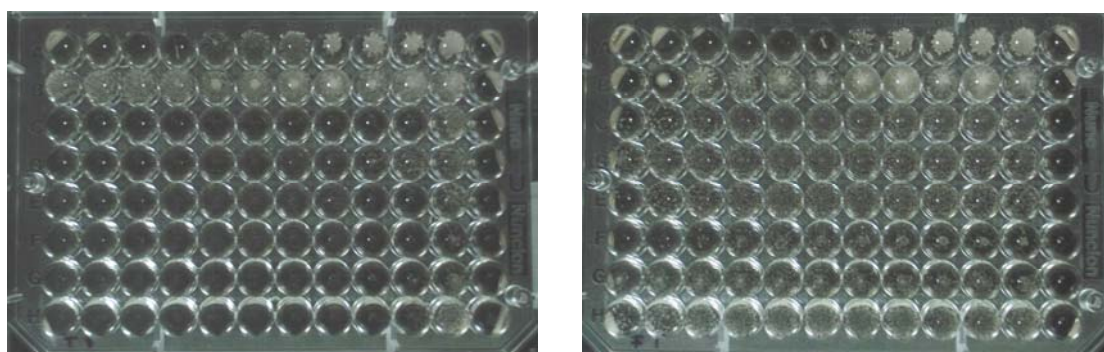
V.1 RESULTADOS

En la tabla 2 se muestran los resultados de la CMI 50 y 90 de los aislamientos de *S. schenckii* en su fase levaduriforme a los diferentes antifúngicos estudiados. En general, los valores de CMI₉₀ para ITZ, KTZ y VRZ obtenidos en esta fase de crecimiento fueron muy similares y sin diferencias significativas. Por otro lado, se observa una diferencia marcada de los valores de CMI para TRB en comparación con las CMI's de los compuestos azoles. Los valores de CMI muy elevados de FLZ demuestran la pobre actividad de la droga frente a esta fase de crecimiento del hongo. De los antifúngicos del grupo de los azoles, KTZ fue la droga que mostró mayor actividad antifúngica en 17 de los aislamientos de *S. schenckii* estudiados. De la misma manera AMB tuvo buena actividad antifúngica, solo en uno de los aislamientos (ECD 886) se presentó pobre actividad. Cabe mencionar que este aislamiento también mostró valores altos de CMI a los azoles probados. Finalmente, los 18 aislamientos estudiados mostraron los valores de CMI más bajos frente a TRB (figura 19).

TABLA 2. CMI's en la fase levaduriforme de los 18 aislamientos de *S. schenckii* frente a los diferentes antifúngicos estudiados ($\mu\text{g/ml}$).

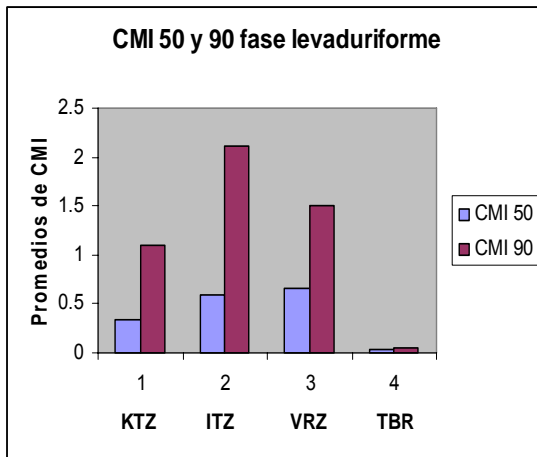
Clave	KTZ ₅₀	KTZ ₉₀	ITZ ₅₀	ITZ ₉₀	FLZ ₅₀	FLZ ₉₀	VRZ ₅₀	VRZ ₉₀	TRB ₅₀	TRB ₉₀	AMB ₁₀₀
C	0.25	1.0	0.25	1.0	16.0	32.0	0.5	1.0	0.03	0.06	2.0
F	0.25	0.5	0.5	1.0	8.0	16.0	0.25	0.5	0.06	0.125	0.5
S	0.06	1.0	0.5	1.0	16.0	64.0	2.0	4.0	0.03	0.06	0.5
X	0.5	0.5	0.5	1.0	8.0	32.0	0.25	0.5	0.03	0.06	0.125
Z	0.125	0.5	0.25	1.0	16.0	32.0	0.25	0.5	0.03	0.03	0.06
712GEA	0.5	1.0	0.5	2.0	32.0	64.0	0.25	1.0	0.03	0.06	0.5
713GEA	0.25	0.5	0.25	1.0	8.0	16.0	0.25	1.0	0.03	0.03	0.5
329	0.25	0.5	0.5	1.0	32.0	64.0	0.25	1.0	0.03	0.06	2.0
25084	0.25	1.0	0.25	2.0	32.0	64.0	0.25	1.0	0.03	0.03	0.25
48903	0.06	0.125	0.125	1.0	16.0	32.0	0.25	0.25	0.03	0.06	1.0
57794	0.5	1.0	0.25	2.0	>64	>64	1.0	2.0	0.03	0.06	0.5
73096	0.5	1.0	0.25	1.0	32.0	64.0	0.125	0.5	0.03	0.03	0.25
77400	0.125	0.25	0.25	1.0	32.0	64.0	0.5	2.0	0.06	0.125	0.5
82799	0.25	0.5	0.5	2.0	16.0	32.0	0.25	0.5	0.03	0.03	1.0
115197	0.25	0.25	0.5	1.0	16.0	32.0	0.03	0.5	0.03	0.06	0.25
116902	0.5	1.0	1.0	2.0	32.0	64.0	1.0	2.0	0.03	0.06	1.0
18397	0.5	1.0	0.25	1.0	16.0	64.0	0.5	1.0	0.03	0.06	1.0
886	1.0	8.0	4.0	16	16.0	32.0	4.0	8.0	0.03	0.06	4.0
MG	0.34	1.09	0.59	2.11	22.66	46.22	0.66	1.51	0.033	0.06	0.88
INTERVALO	0.06-1.0	0.125-8.0	0.12-4.0	1.0-16.0	8.0 ->64	16.0->64	0.03-4.0	0.25-8.0	0.03-0.06	0.03-0.12	0.125-4.0

MG media geométrica

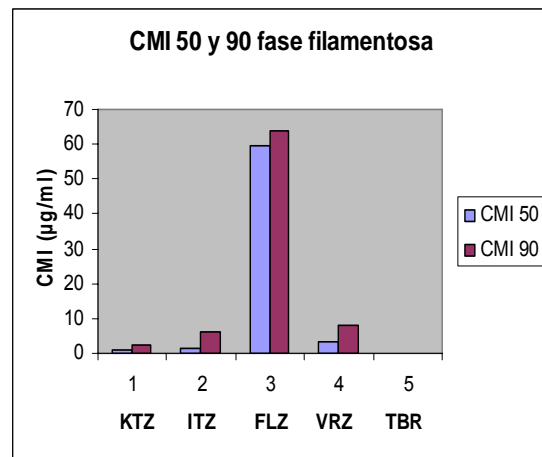


A B
Figura 19. Microdilución en placa en fase levaduriforme de *S. schenckii* con: A) TRB; y B) FLZ

En la gráfica 1 se observa la comparación entre los valores de CMI 50 y 90 a los diferentes antifúngicos estudiados contra *S. schenckii* en su fase levaduriforme. Los valores de CMI₅₀ obtenidos para KTZ, ITZ y VRZ fueron menores comparados con los de CMI₉₀, para el caso de TRB se presentaron valores muy similares, no obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.



Gráfica 1. Comparación entre la CMI₅₀ y CMI₉₀ en la fase levaduriforme en los 18 aislamientos de *S. schenckii*.

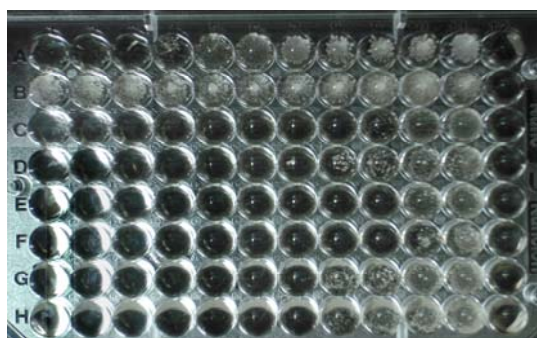


Gráfica 2. Comparación entre la CMI₅₀ y CMI₉₀ en la fase filamentosa en los 18 aislamientos de *S. schenckii*.

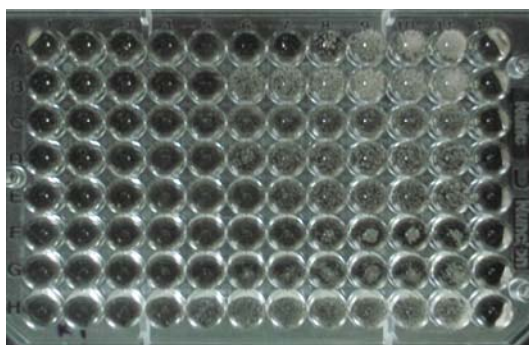
En la tabla 3 se muestran los resultados de la CMI 50 y 90 de los aislamientos de *S. schenckii* en su fase filamentosa a los diferentes antifúngicos estudiados. Al comparar únicamente los valores de CMI₉₀ en ITZ, KTZ y VRZ con los de TRB, fue evidente que esta última droga mostró la mayor actividad en todos los aislamientos de *S. schenckii*, el resultado fue estadísticamente significativo. El análisis estadístico mostró diferencia significativa en KTZ al compararlo con ITZ y VRZ. TRB y KTZ mostraron mayor actividad en todos los aislamientos probados (figura 20). De los valores de CMI₉₀ el 55.5% de los aislamientos frente a VRZ estuvieron en un intervalo de 8 a 16µg/ml, comparado con el 38.8% frente a ITZ. A pesar de que no se han establecido aún los puntos de corte de las drogas antifúngicas para los hongos filamentosos, podemos inferir menor actividad antifúngica de FLZ frente a los 18 aislamientos estudiados.

TABLA 3. CMI's en la fase filamentosa de los 18 aislamientos de *S. schenckii* frente a los diferentes antifúngicos estudiados ($\mu\text{g/ml}$).

Clave	KTZ ₅₀	KTZ ₉₀	ITZ ₅₀	ITZ ₉₀	FLZ ₅₀	FLZ ₉₀	VRZ ₅₀	VRZ ₉₀	TRB ₅₀	TRB ₉₀
C	0.5	4.0	0.5	8.0	> 64	> 64	2.0	16.0	0.03	0.06
F	0.25	0.5	0.5	1.0	> 64	> 64	1.0	2.0	0.03	0.06
S	2.0	4.0	8.0	16.0	> 64	> 64	8.0	16.0	0.03	0.06
X	0.5	2.0	1.0	2.0	> 64	> 64	2.0	4.0	0.03	0.06
Z	1.0	2.0	4.0	8.0	> 64	> 64	4.0	8.0	0.03	0.06
712GEA	1.0	2.0	2.0	8.0	> 64	> 64	2.0	4.0	0.06	0.125
713GEA	1.0	2.0	0.5	2.0	16.0	64.0	1.0	2.0	0.06	0.125
329	0.5	1.0	0.5	1.0	32.0	> 64	2.0	4.0	0.03	0.06
25084	1.0	2.0	1.0	8.0	> 64	> 64	2.0	4.0	0.03	0.06
48903	0.25	0.5	0.5	2.0	> 64	> 64	4.0	8.0	0.03	0.06
57794	0.5	2.0	1.0	8.0	> 64	> 64	1.0	16.0	0.06	0.125
73096	1.0	4.0	0.5	16.0	> 64	> 64	4.0	8.0	0.03	0.06
77400	0.5	1.0	0.5	2.0	> 64	> 64	2.0	4.0	0.06	0.125
82799	1.0	2.0	0.5	2.0	> 64	> 64	4.0	8.0	0.06	0.125
115197	0.5	1.0	0.5	2.0	> 64	> 64	4.0	8.0	0.03	0.06
116902	0.5	2.0	1.0	4.0	> 64	> 64	4.0	8.0	0.125	0.25
18397	1.0	4.0	2.0	16.0	> 64	> 64	8.0	16.0	0.06	0.125
886	1.0	4.0	1.0	2.0	> 64	> 64	4.0	8.0	0.03	0.06
MG	0.78	2.22	1.42	6.0	59.6	64.0	3.28	8.0	0.045	0.09
Rango	0.25 – 2.0	0.5 – 4.0	0.5 – 8.0	1.0 – 16.0	16.0 – >64	64.0 – >64	1.0 – 8.0	2.0 – 16.0	0.03 – 0.125	0.06 – 0.25



A

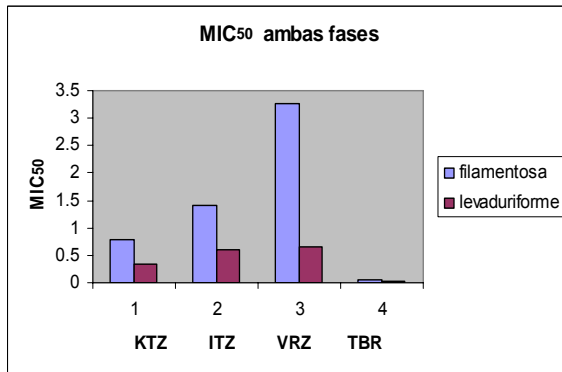


B

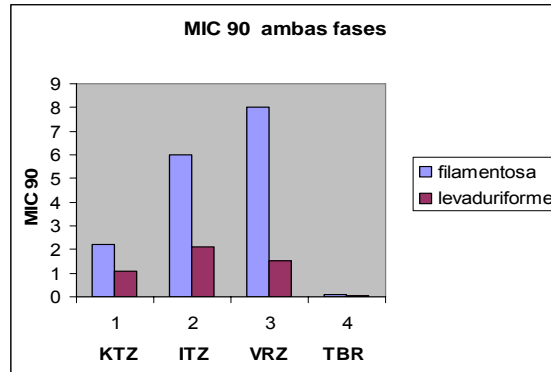
Figura 20. Microdilución en placa en fase filamentosa de *S. schenckii* con: A) TRB; y B) KTZ.

En la gráfica 2 se observa la comparación entre los valores de CMI 50 y 90 a los diferentes antifúngicos estudiados contra *S. schenckii* en su fase filamentosa. Observamos un comportamiento similar para KTZ, ITZ, VRZ y TBR sin diferencias estadísticamente significativas y nuevamente FLZ mostró los valores más elevados de CMI.

En las gráficas 3 y 4 observamos la comparación de CMI 50 y 90 entre ambas fases de crecimiento respectivamente. Fue evidente que la fase filamentosa tuvo los valores de CMI más elevados que la fase levaduriforme por una ó dos diluciones para todos los antifúngicos.



Gráfica 3. Comparación de CMI₅₀ en ambas fases.



Gráfica 4. Comparación de CMI₉₀ en ambas fases.

En la tabla 4 se presentan las CMF para la fase filamentosa del hongo, el parámetro para determinar la CMF fue la concentración que dio 3 ó menos unidades formadoras de colonias (figura 21); podemos observar que todos los azoles mostraron CMF mayores a los correspondientes para TRB, en la gráfica 5, se observan claramente los valores elevados de CMF de los azoles en comparación a los valores de TRB.

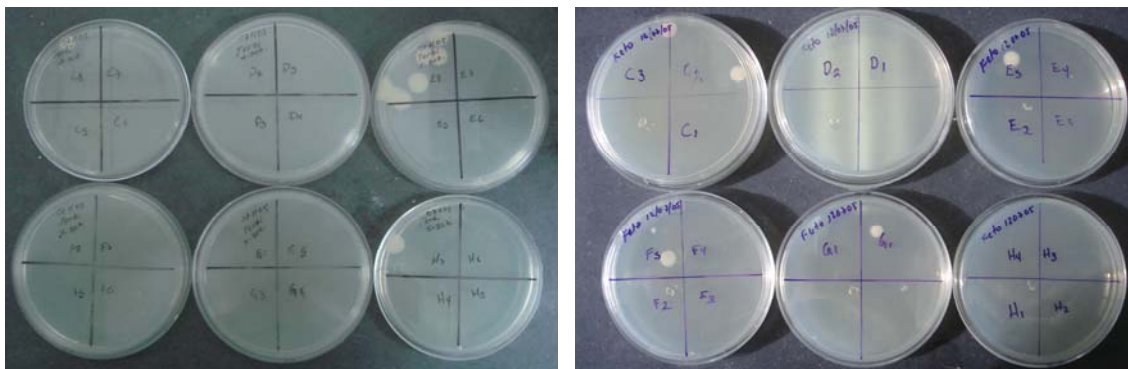
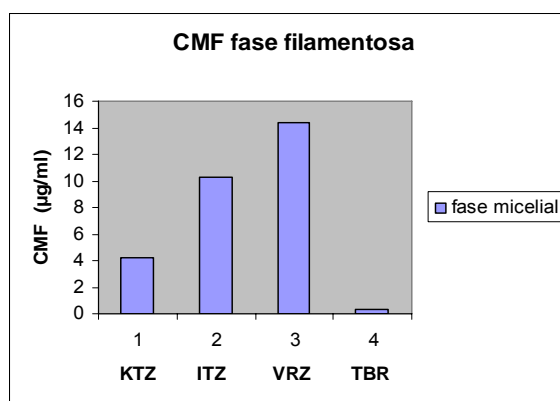


Figura 21. CMF en la fase filamentosa de *S. schenckii* con: A) TRB; y B),KTZ

TABLA 4. CMF en la fase filamentosa de los 18 aislamientos de *S. schenckii* frente a los diferentes antifúngicos estudiados ($\mu\text{g/ml}$).

CLAVE	KTZ	ITZ	FLZ	VRZ	TBR
C	8	16	> 64	16	0.125
F	1	2	> 64	4	1.0
S	4	16	> 64	16	0.125
X	2	16	> 64	8	0.125
Z	2	8	> 64	16	0.250
712GEA	2	8	> 64	16	0.5
713GEA	4	8	> 64	16	0.125
329	1	4	> 64	8	0.125
25084	2	16	> 64	16	0.125
48903	4	2	> 64	16	0.250
57794	4	16	> 64	> 16	0.250
73096	8	> 16	> 64	16	0.250
77400	4	4	> 64	16	1
82799	2	8	> 64	16	0.250
115197	2	4	> 64	16	0.125
116902	2	8	> 64	16	0.5
18397	16	> 16	> 64	> 16	0.250
886	8	16	> 64	16	0.250
MG	4.22	10.22	> 64	14.4	0.34



Gráfica 5. CMF en fase filamentosa en los 18 aislamientos de *S. schenckii*.

Los resultados de este estudio mostraron valores de CME en un intervalo de 2 a $16\mu\text{g/ml}$ solo para ITZ, que correspondieron al pozo siguiente de mayor concentración del valor de CMI_{90} . Sólo con este antifúngico se observó crecimiento anormal de las hifas de *S. schenckii*, hifas irregulares, con

ramificaciones cortas, algunas con ensanchamientos y constricciones, dando la apariencia de “hifas en raqueta” (figura 22). En el caso de KTZ, VRZ y TRB, a pesar de que presentaron la mayor actividad antifúngica no se observaron cambios en la morfología de las hifas (figura 23). La CME no se evaluó para FLZ, ya que los valores de CMI fueron mayores a la concentración más alta de la droga (64 µg/ml).

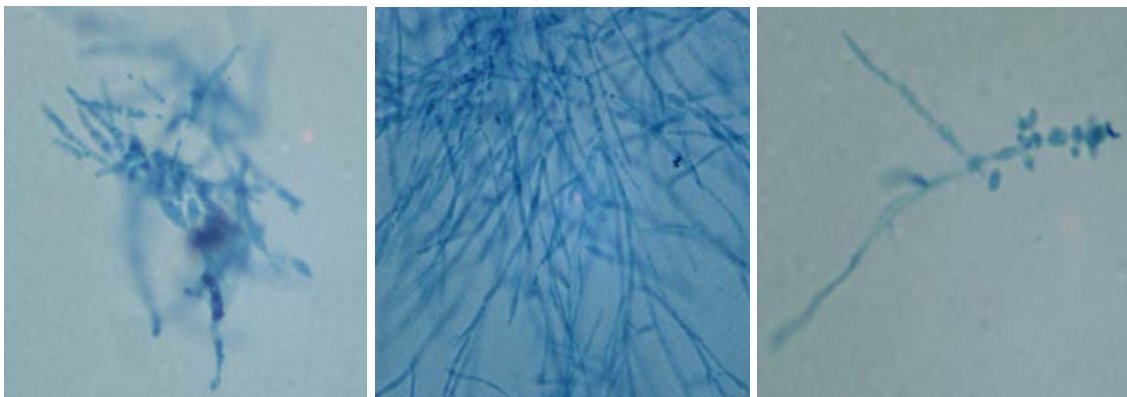


Figura 22. Morfología microscópica de *S. schenckii* con crecimiento anormal de las hifas por efecto de ITZ. A, hifas con ramificaciones cortas y gruesas B, hifas abundantes C, hifas irregulares (ensanchamientos y constricciones)

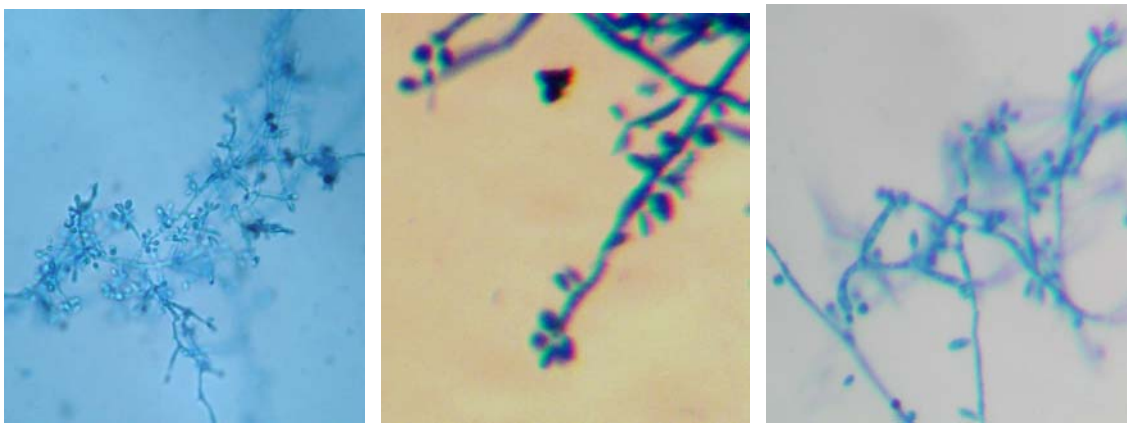


Figura 23., Crecimiento normal de hifas de *S. schenckii* con: A, KTZ B, VRZ y C, TRB

Por otra parte, en todos los aislamientos de *S. schenckii* estudiados se obtuvo una buena transformación de la fase de crecimiento micelial a la fase levaduriforme en el caldo RPMI 1640 (figura 24).

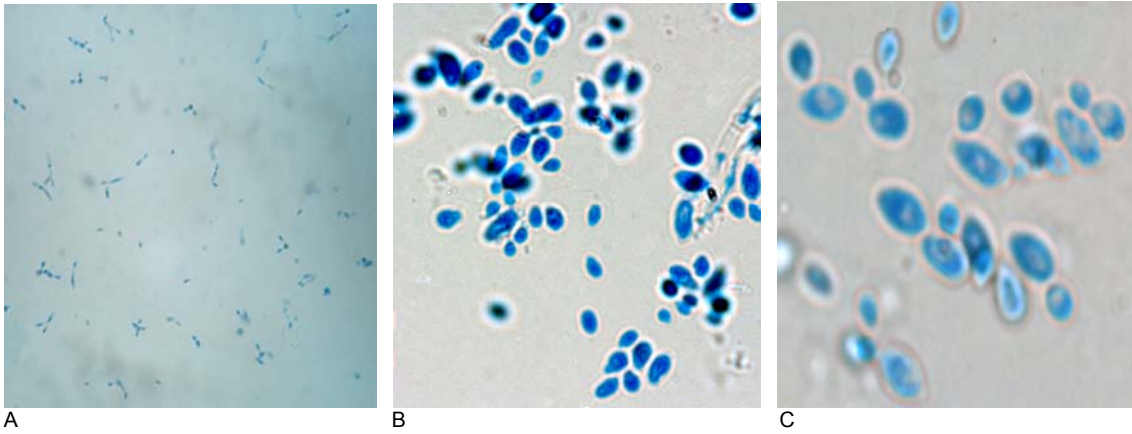


Figura 24. Levaduras de *S. schenckii*. A, 40X B, 100X C, 100X

En el examen microscópico, directo con azul de algodón de los cultivos en el caldo RPMI de *S. schenckii*, observamos polimorfismo de las levaduras como: levaduras unigemantes, bigemantes, multigemantes, y la típica descripción levaduras con proyecciones digitiformes y las formas alargadas que semejan cuerpos en “cigarro” (figura 25).

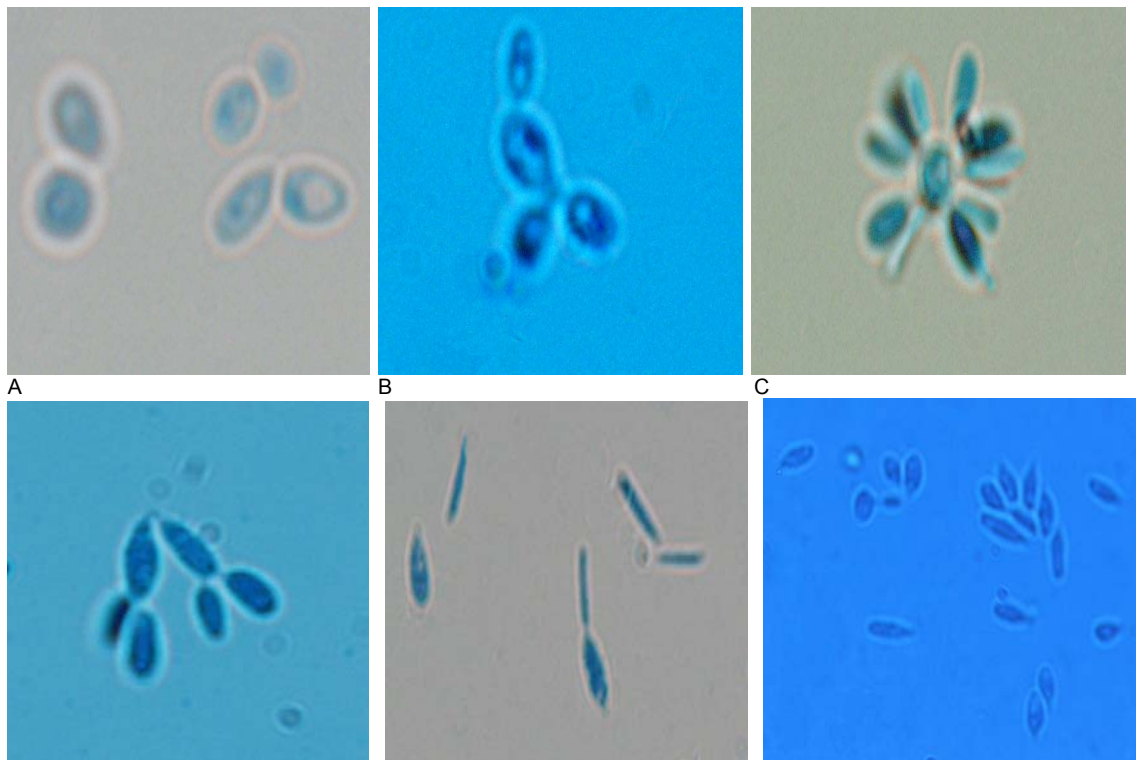


Figura 25. Levaduras de *S. schenckii*. A, unigemantes B, bigemante C, multigemante D, ovaladas E, con proyecciones digitiformes F, ovaladas

Finalmente cabe mencionar que los intervalos de CMI para KTZ, ITZ, VRZ, FLZ y AMB en las cepas control de calidad estuvieron dentro de los intervalos esperados.

CAPÍTULO VI

VI.1 DISCUSIÓN

En torno a la actividad *in vitro* de TRB frente a las dos fases de crecimiento de *S. schenckii* solo se han descrito algunos estudios, principalmente contra la fase micelial más que contra la fase levaduriforme del hongo, los resultados del presente estudio coinciden con los reportados por Kholer L y cols [31] donde observaron alta actividad de TRB frente a la fase levaduriforme del hongo. En este estudio también encontramos alta actividad de TRB frente a la fase micelial, tal como lo reportó Trilles L y cols [66]. Nuestros resultados en relación a TRB correlacionan con el repote de Chapman S y cols [10] acerca de la eficacia de la droga en 63 pacientes con ELC y ECF, cuando se les administraron dosis de 1000 mg/día.

En este estudio observamos una pobre actividad antifúngica de FLZ frente a ambas fases de crecimiento de *S. schenckii*, como previamente lo describió Espinel A [16]. Por otra parte, Kauffman y cols [30] reportaron la eficacia de este antifúngico en el tratamiento clínico de ELC, con buenos resultados, no obstante, ante las evidencias observadas *in vitro* sería conveniente no indicarla como droga de elección para el control de esta micosis, ya que la resistencia *in vitro* implica falla terapéutico.

En diferentes publicaciones internacionales y en este trabajo las CMI's revelaron valores bajos para ambas fases de crecimiento del hongo frente a ITZ [31,43]; por su parte, VRZ reveló pobre actividad antifúngica frente a los aislamientos estudiados en su fase micelial, esto concuerda con los resultados encontrados por Mc Ginnins y cols [40], Espinel A y cols [17] y Johnson E y

cols [27], sin embargo esta droga mostró mejor actividad que ITZ en fase levaduriforme.

AMB mostró buena actividad antifúngica para la fase levaduriforme del hongo, lo cual coincide con los resultados reportados por Trilles L y cols [66].

Nuestros resultados también coinciden con los encontrados por Trilles L y cols [66] y Shadomy y cols [62] quienes reportaron *in vitro* buena actividad antifúngica de KTZ frente a la fase micelial de este hongo, no obstante, en el presente estudio encontramos menor actividad en la fase levaduriforme del hongo frente a este antifúngico, lo cual podría correlacionarse con lo encontrado por Lortholary y cols [38], quienes reportaron pobre eficacia de esta droga frente a diferentes formas clínicas de esporotricosis.

Uno de los hallazgos interesantes en el presente estudio fue la baja actividad *in vitro* de los azoles y AMB probados en uno de los aislamientos obtenidos de un paciente con ECD; mientras que TRB mostró alta actividad frente a este mismo aislamiento, tomando en consideración los resultados obtenidos con TRB se podría sugerir el uso de este antifúngico como una alternativa para el tratamiento de las formas cutáneas de esporotricosis. Sin embargo, aparentemente no es un tratamiento para las formas extracutáneas, como lo reportó Kan VL y cols [28], donde TRB no fue eficaz en el tratamiento de esporotricosis extracutánea experimental en ratones.

Al comparar las CMI's obtenidas en las fases levaduriforme y micelial de *S. schenckii* frente a KTZ, ITZ, VRZ y TRB, fueron evidentes los valores más bajos en la fase levaduriforme, hallazgo similar al reportado por Trilles L y cols [66]; sin embargo, Nakai T y cols [46] describieron que la fase filamentosa fue más sensible que la levaduriforme de *S. schenckii* en presencia de ITZ, por lo

que posiblemente el patrón de sensibilidad *in vitro* de *S. schenckii* frente a estos antifúngicos dependa de la fase de crecimiento del hongo.

Los resultados obtenidos en el presente estudio de CMF para la fase filamentosa coinciden con los encontrados por Jonson E y cols [27] y McGinnins y cols [40] quienes también reportaron valores altos de CMF para los azoles, confirmando que estas drogas no muestran efecto fungicida sobre *S. schenckii*.

Los resultados obtenidos de CME en este trabajo revelaron el hecho de que concentraciones de ITZ cercanas a las CMI₉₀ para este mismo antifúngico, son capaces de provocar cambios en la morfología de las hifas del hongo, no sucedió así para las otras drogas antifúngicas utilizadas.

Para la transformación de *S. schenckii* de la fase micelial a la levaduriforme se han empleado diversos medios de cultivo como agar sangre, agar infusión cerebro corazón y agar sangre glucosa-cisteína con buenos resultados, otros investigadores como Trilles L y cols [66] usaron el método descrito por Ghosh y cols [23] con resultados deficientes. En este trabajo se decidió emplear el caldo RPMI 1640 por ser el medio de cultivo ideal para el estudio de sensibilidad antifúngica, mediante el cual optimizamos la transformación, en la literatura no existe un documento previo de la utilidad de este medio en la transformación de *S. schenckii*, de tal manera que sería una buena alternativa y quizá para otros de los hongos dimórficos.

Es importante realizar estudios que correlacionen la sensibilidad *in vitro* con la respuesta clínica en las formas cutáneas y extracutáneas de esporotricosis, para detectar la aparición de cepas resistentes, ya que se desconoce la

frecuencia y relevancia clínica de este fenómeno en *S. schenckii* y en otros hongos filamentosos.

VI.2 CONCLUSIONES

- TRB puede ser una buena alternativa en el tratamiento de las formas clínicas cutáneas de esporotricosis, ya que mostró excelente actividad fungicida y fungistática frente a ambas fases de crecimiento de los aislamientos estudiados de *S. schenckii*.
- KTZ, ITZ y VRZ tuvieron buena actividad antifúngica y a pesar de que KTZ presentó mayor actividad antifúngica, su hepatotoxicidad limitaría su uso en el tratamiento de la enfermedad.
- La pobre actividad antifúngica de FLZ *in vitro* frente a las dos fases de crecimiento de *S. schenckii* encontrada en este trabajo, limita su uso en el tratamiento de la enfermedad a pesar de que ha sido considerada como de segunda elección en el tratamiento de esporotricosis.
- La fase levaduriforme fue más sensible al efecto antifúngico de las drogas usadas que la fase filamentosa.
- El caldo RPMI 1640 es un medio de cultivo que optimiza la transformación de la fase de crecimiento micelial a la levaduriforme en los aislamientos de *S. schenckii* estudiados.

Bibliografía

1. Aracena T, Padilla MC, Suchil P, Navarrete-Franco G, Reynoso S. Esporotricosis facial fija en una lactante. Rev Cent Dermatol Pascua 1994; 3: 132-134.
2. Arenas R. Esporotricosis en: Micología médica ilustrada (2ª ed). México DF, Mc Graw Hill, 2003: 128-137.
3. Arikan S, Yurdakul P, Hascelik G. Comparison of two Methods and three end points indetermination of *in vitro* activity of micafungin against *Aspergillus spp*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 2640-2643.
4. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. *In vitro* susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 327-330.
5. Basak C, Yunus S, Nusret A, Aarhus A y Demet C. Sporotrichoses successfully treated with terbinafine and potassium iodide: Case report and review of the literature. Mycopathología 2004; 158: 53-56.
6. Bonifaz A. Esporotricosis en: Micología médica básica (2ª ed). México DF, Méndez editores, 2002: 185-206.
7. Cantón E, Martín E, Espinel-Ingroff A. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Rev Iberoam Micol 2001; 15: 1-13.
8. Catalan M, Montejo J C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. Rev Iberoam Micol 2006; 23: 39-49.
9. Carter RL. A dictionary of dermatologic terms. 4ª edición. London: Williams and Wilkins, 1992.

10. Chapman SW; Pappas P, Kauffman C. Smith EB, Dietze R, Tiraboschi-Foss N, Restrepo A, Bustamante AB, Opper C, Emady-Azar S, Bakshi R. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000mg/dia) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. *Mycoses* 2004; 47:62-68.
11. Castro LGM, Belda W Jr, Cuce LC. Successful treatment of sporotrichoses with oral fluconazole: a report of three cases. *J Dermatol* 1993; 128: 352-356.
12. De Araujo T, Marques AC, Kerdel F. Sporotrichoses. *Int Journal Dermatol* 2001; 40: 737-742.
13. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49, Suppl.S1: 7-10.
14. Espinel-Ingroff A. Clinical utility of *in vitro* antifungal susceptibility testing. *Rev Esp Quimoter* 2000; 13:161-166.
15. Espinel-Ingroff A. *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against opportunistic moniliaceosus and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 954-958.
16. Espinel-Ingroff A. *In vitro* fungicidal activities of anidulafungin and micafungin, licensed agents and the investigational triazole posaconazole as determined by NCCLS methods for 12,052 fungal isolates: review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 121-136.
17. Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehar D. *In vitro* antifungal activities of voriconazol and reference agents as determined by NCCLS method review of the literature. *Mycopathología* 2001; 150: 101-115.

18. Espinel-Ingroff A, Chaturvedi V, Fothergill A, Rinaldi M. Optimal Testing Conditions for Determining MICs and Minimum Fungicidal concentration of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS Collaborative Study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3776-3781.
19. Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, Anaissie E, Breslin B, Dixon D, Fothergill A, Paetznick V, Peter J, Rinaldi M, Walsh T. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 314-319.
20. Espinoza-Texis A, Hernández F, Lavalle P, Barba-Rubio J, López-Martínez R. Estudio de 50 pacientes con esporotricosis. Evaluación clínica y de laboratorio. *Gac Med Mex* 2001; 137:111-116.
21. García Matos P, Domínguez I, Marín P, García Agudo R, Aoufi S, Mira J. Sensibilidad a antifúngicos de levaduras patógenas emergentes. *Enf Infec Microbiol Clin* 2001; 19:249-256.
22. Gezuele E, Da Rosa D. Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22:147-150.
23. Ghosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses* 2002; 45: 449-454.
24. González Ochoa A, Kaplan W. The use of fluorescent antibodies in the study of various infectious diseases. Fast diagnosis of sporotrichosis. *Gac Méd Mex* 1964; 94: 309-313.

25. Hay RJ. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. *Br J Dermatol* 1999; 141: 36-40.
26. IZ. Carlos, Sgarbi DBG, Santos GC, Placeres MCP. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophage phagocytosis: involvement of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor. *Scandinavian J Immunol* 2003; 57:214.
27. Johnson EM, Szekely A, Warnock DW. *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42:741-745.
28. Kan LV, Bennett EJ. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. *Antimicrob Agents and Chemother* 1988; 32: 1619-1623.
29. Kauffman CA. Old and new therapies for sporotrichoses. *Clin Infect Dis* 1995; 21: 981-985.
30. Kauffman CA, Pappas PG, McKinsey DS, Greenfield RA, Perfect JR, Cloud GA, Thomas CJ, Dismukes WE. Treatment of lymphocutaneous and visceral sporotrichosis with fluconazole. *Clin Infect Dis* 1996; 22:46-50.
31. Kohler LM, Fialho PC, Hahn RC, Soares J. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4319-4320.
32. Koneman EW, Roberts GD. Esporotricosis en: *Micología. Prácticas de laboratorio* (3^a ed). Argentina BA, Panamericana, 1987: 145.
33. Lavalle P. Esporotricosis en: *Desarrollo y estado actual de la micología médica en México*. Simposio Sintex México DF, Ediciones del Instituto Sintex, 1979: 115-136.

34. Lavalle P, Padilla MC, Mora S, Reynoso S, Rodríguez J. Micetomas, cromomicosis y esporotricosis en el estado de Veracruz. Datos del servicio de micología del Centro Dermatológico Pascua (1956- 2001). *Rev Mex Dermatol* 2004; 48: 13-27.
35. López-Jodra O, Torres Rodríguez JM, Méndez-Vázquez E. In Vitro susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates to five antifungal drugs using a colorimetric system and the reference microbroth method. *J Chemother* 2000; 45: 645-649.
36. López R, Méndez L, Hernández F, Castañón R. Esporotricosis en: *Micología médica* (1^a ed). México DF, Trillas 1995: 111-13.
37. Magaña M, Magaña L, Cazarín B. Esporotricosis en: *Dermatología* (1^a ed). México DF, Panamericana 2003: 133-136.
38. Lortholary O, Denning DW, Dupont B. Endemic mycoses: a treatment update. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:321-331.
39. Mazuelos E, Gutierrez MJ, Aller AI. A comparative evaluation of E-test and microdilution broth method for fluconazole and itraconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2000; 43: 477-481.
40. Mc Ginnis MR, Nordoff N, Li RK, Pasarell L, Warnock DW. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericine B. University of Texas Medical Branch, Galveston, USA. *Med Mycol* 2001; 39: 369-371.
41. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002; 20: 523-530.

42. Méndez LJ, Anides-Fonseca AE, Peña-González G, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Hernández-Hernández F, Almeida-Arvizu VM. Esporotricosis cutánea fija. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 150-152.
43. Morera-López Y, Torres-Rodríguez JM, Jiménez-Cabello T. Estudio de la sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de mohos y levaduras a itraconazol y voriconazol. Rev Iberoam Micol 2005; 22: 105-109.
44. Morris RJ. Sporotrichosis. Clin Exp Dermatol 2002; 27: 427-431.
45. Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 556-557.
46. Nakai T, Uno J, Ikeda F, Tawara S, Nishimura K, Miyaji M. *In vitro* antifungal activity of micafungina (FK463) against dimorphic fungi: comparison of yeast-like and mycelial forms. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1376-1381.
47. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
48. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
49. Novales J, Navarrete G, Ramos A. Esporotricosis. Aspectos histológicos, análisis de 50 casos. Rev Cent Dermatol Pascua 1995; 4: 149-152.
50. Ozcan A, Senol M, Karaca S, Sener S, Polat M, Ozerol IH. A case of sporotrichosis treated with itraconazole. Med Mycol 2003; 41: 443-445.

51. Padilla MC, Lopezello AL. Esporotricosis linfangítica. Presentación de un caso. Rev Cent Dermatol Pascua 2002; 11: 153-157.
52. Padilla MC, Novales J, Zuloeta E, Collado MK. Esporotricosis cutánea fija. presentación de un caso. Rev Cent Dermatol Pascua 2002; 11: 122-124.
53. Pang KR, Wu JJ, Huang BD, Tying SK. Subcutaneous fungal infections. Dermatol Ther 2004; 17: 523-31.
54. Perez A. Terbinafine: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. Mycoses 1999; 42 Suppl 2: 111-4.
55. Polleti ED, Michel JA, Arenas R, Martínez L, Arce FJ. Esporotricosis infantil : otro simulador clínico. Informe de 4 casos. Rev Mex Dermatol 2004; 48: 105-5.
56. Restrepo A, Robledo J, Gómez I, Tabares AM, Gutierrez R. Itraconazole therapy in lymphangitic and cutaneous sporotrichosis. Arch Dermatol 1986; 122: 413-417.
57. Rex JH, Michael A, Pfaller A, Michael G, Rinaldi, Polak A, Galgiani J. Antifungal Susceptibility Testing. Clin Microb Rev. 1993; 6: 367-381.
58. Rex JH, Yurdakul P, Hascelik G. Comparison of two Methods and Three end points in determination of *in vitro* activity of micafungin against *Aspergillus spp.* Antimicrob Agents and Chemother 2003; 47: 2640-2643.
59. Rocha MM, Bassin T, Lira R, Lima EL, Severo C, Londero AT. Sporotricosis in patient with AIDS report of a case and review. Rev Iberoam Micol 2001; 18: 133-136.

60. Romero R. Esporotricosis en: Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas (2ª ed). México DF, Panamericana, 2001: 502.
61. Sandhu K, Gupta S. Potassium iodide remains the most effective therapy for cutaneous sporotrichosis. J Dermatol Treat 2003; 14: 200-202.
62. Shadomy S, White SC, Yu MP, Dismukes WE. Treatment of systemic mycoses with ketoconazole: *in vitro* susceptibilities of clinical isolates of systemic and pathogenic fungi to ketoconazole. J Infect Dis 1985; 152:1249-1256.
63. Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002; 2:73-85.
64. Shinogi T, Misago N, Narisawa Y. Cutaneous sporotrichosis with refractory and reinfectious lesions in a healthy female. J Dermatol 2004; 31: 492-496.
65. Torres-Mendoza BM, Vázquez-Valls E, González-Mendoza A. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune en la esporotricosis. Rev Iberoam Micol 1997; 14:98-100.
66. Trilles L, Fernández-Torres B, Dos Santos-Lazéra M, Wanke B, Oliveira-Schubach A, De Almeida-Paes R, Inza I, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3952-3954.
67. Unemoto M, Demitsu T, Osawa M, Toda S, Kawasaki M, Mochizuki T. Sporotrichosis in a Husband and wife. J Dermatol 2005; 32: 569-573.

68. Velazco O, Tay J. Esporotricosis en: Introducción a la micología médica (2ª ed). México DF, Méndez editores, 2004: 285-88.
69. Velegraki A. Update on antifungal resistance. Mycology newsletter 2006; 1: 12-13.
70. Villanueva E, Vega X, Novales J. Esporotricosis cutaneolinfangítica. Rev Cent Dermatol Pascua 1993; 2: 129-131.
71. Zapater RC. Esporotricosis en: Micología médica (1ª ed). Argentina BA, El ateneo, 1981: 146.

APÉNDICE

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

- CALDO RPMI 1640

MOPS	34.5g
Glucosa	0.2g
RPMI (Gibco ®)	10g
Agua	1lt. desionizada.

Mezclar glucosa, MOPS y $\frac{3}{4}$ del litro de agua en un vaso de precipitados, ajustar a pH 7.00 ± 0.1 con NaOH en agitación constante, agregar RPMI y aforar a un litro, ajustar a pH 7.00 ± 0.1 . Esterilizar por filtración con unidades filtro estériles de poro $0.2\mu\text{m}$. almacenar a 4°C .

- AGAR DEXTROSA SABOURAUD (BD Bioxon ®)

Dextrosa	40.0g
Peptona de carne	5.0g
Peptona de caseína	5.0g
Agar	15.0g
Agua destilada	1lt

Suspender 65g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta disolver el polvo. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Verter en cajas de Petri.

- AGAR PAPA DEXTROSA (Bioxon®)

Infusión de Papa	4.0g
Dextrosa	20.0g

Agar 15.0g

Agua destilada 1lt

Suspender 39g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar agitando frecuentemente hasta disolver el polvo, verter 7 ml en tubos con tapón de rosca. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

- AGAR DEXTROSA SABOURAUD CON ANTIBIÓTICO (BBL Mycosel agar®)

Harina de soya digerida por enzimas papaínicas 10g

Dextrosa 10g

Agar 15.5g

Cicloheximida 0.4g

Cloramfenicol 0.05g

Suspender 36g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar y calentar agitando frecuentemente hasta disolver el polvo, Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Verter en cajas de Petri.

- SOLUCIÓN SALINA ESTÉRIL

NaCl 0.85g

Agua destilada 100ml

Mezclar el NaCl con el agua hasta disolver. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADS	Agar Dextrosa Sabouraud
AMB	anfotericina B
APD	Agar Papa Dextrosa
ATCC	Colección Americana de Cepas tipo
<i>Ck</i>	<i>Candida krusei</i>
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CME	Concentración Mínima Efectiva
CMF	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
<i>Cp</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECF	Esporotricosis Cutánea Fija
ECL	Esporotricosis Cutánea Linfangítica
ECD	Esporotricosis Cutánea Diseminada
FLZ	Fluconazol
ITZ	Itraconazol
KI	Yoduro de Potasio
KTZ	Ketoconazol
MOPS	Ácido morfolino propano sulfónico
NaCl	Cloruro de Sodio
R	Resistencia
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Sensibilidad
SDD	Sensibilidad Dosis Dependiente

SSI	Solución Salina Isotónica
TRB	Terbinafina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VRZ	Voriconazol
5FC	5 Fluorocitosina